Aus der Medizinischen Universitätsklinik
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.A. Martini

DIE BEDEUTUNG POLYMORPHKERNIGER LEUKOCYTEN FÜR DIE MITOGENINDUZIERTE PROLIFERATION AUTOLOGER LYMPHOCYTEN UND DIE MÖGLICHE BETEILIGUNG IHRER PROTEOLYTISCHEN ENZYME

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

MARIA-DOROTHEA ELGETI, geb. Cappeller
aus Marburg

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.A. Martini

DIE BEDEUTUNG POLYMORPHKERNIGER LEUKOCYTEN FÜR DIE MITOGENINDUZIERTE PROLIFERATION AUTOLOGER LYMPHOCYTEN UND DIE MÖGLICHE BETEILIGUNG IHRER PROTEOLYTISCHEN ENZYME

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

MARIA-DOROTHEA ELGETI, geb. Cappeller

aus Marburg

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 11. 5. 76
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan: Prof. Dr. Oepen
Referent: Priv. Doz. Dr. Malchow
Correferent: Prof. Dr. Müller

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 1

II. Methode 6

III. Ergebnisse 14

1. Einfluß polymorphkerniger Leukocyten auf die mitogeninduzierte Lymphocytenproliferation

2. Einfluß zugesetzter polymorphkerniger Leukocyten im Vergleich zu zugesetzten Lymphocyten

3. Dichtestudien

4. Einfluß der Ammoniumchloridbehandlung Zusammenfassende Darstellung aller Versuche, die die Proliferationsförderung durch polymorphkernige Leukocyten betreffen

5. Einfluß von Serumfaktoren

6. Einfluß von Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten auf die mitogeninduzierte Lymphocytenproliferation

7. Die Wirkung von Enzymen und Enzyminhibitoren

8. Spezifische Proliferationsstudien mit Hilfe von Tuberkulin

IV. Diskussion 45

A. Methode

B. Ergebnisse

V. Zusammenfassung 66

Literaturverzeichnis

Anhang: Tabellen

Lebenslauf

Verzeichnis der akademischen Lehrer

I Einleitung

Es ist lange bekannt, daß bei immunologischen Prozessen Zellen verschiedenen geweblichen Ursprungs miteinander kooperieren, ohne daß über die detaillierten Mechanismen ihrer Zusammenwirkung schon heute klare Erkenntnisse vorlägen. Dennoch darf eine Reihe von experimentellen Daten, die in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren erzielt worden sind, als gesichert gelten.

So weiß man, daß für die Antikörperproduktion Interaktionen von T- und B-Lymphocyten notwendig sind, obwohl ausschließlich B-Lymphocyten Antikörper produzieren. Am Beispiel von bestrahlten Mäusen, denen entweder T- oder B-Zellen oder aber ein Gemisch beider injiziert wurden, zeigten Claman H. et al. 1966, daß B-Zellen ("effector cells") nur in Gegenwart von T-Zellen ("auxiliary cells") zu antikörperproduzierenden Zellen differenzieren können.

Bei der sogenannten Zellulären Cytotoxicität hingegen wiesen Goldstein et al. 1971 nach, daß B-Zellen hier eine untergeordnete Rolle spielen, sie wird allein durch T-zell-spezifische Rezeptoren verursacht.

1972 fanden Gelfand et al. heraus, daß neben der allein durch T-Lymphocyten vermittelten zellgebundenen Cytotoxicität z. B. gegen Hühnererythrocyten auch eine solche existiert, die von den im Versuchsansatz vorhandenen phagocytären Zellen ausgeht. Die Autoren zeigten, daß die "adherent oder phagocytic cells" (d. h. Makrophagen und polymorphkernige Leukocyten) eine unmittelbare Lyse der "target cells" bewirken, während die durch T-Zellen vermittelte spezifische Cytotoxicität erst in späteren Stadien erkennbar wird. Der cytotoxische Effekt der phagocytären Zellen trat schon bei Zusatz von 5×10^4 Zellen auf. Diese Zahl entspricht 0,5 Prozent der üblicherweise zugesetzten Effektorzellen (Lymphocyten aus Lymphknoten oder Milz). Es wurde jedoch weder der Mechanismus dieser durch Phagocyten hervorgerufenen Cytotoxicität geklärt, noch die Frage beantwortet, welche der "adherent cells", Monocyten bzw. Makrophagen oder polymorphkernige Leukocyten, diesen Effekt hervorrufen.

Winkelstein 1970 prüfte die Funktion von T- und B-Lymphocyten bei mitogenstimulierten Lymphocytenkulturen. Er zeigte, daß T- oder B-Lymphocyten allein kaum eine Proliferation nach Stimulation mit PHA aufwiesen, daß jedoch die Kombination von T- und B-Lymphocyten eine signifikante Erhöhung der Proliferation nach Stimulation durch PHA hervorrief.

Gery et al. 1972 stellten in ihren Versuchen fest, daß durch PHA ausschließlich T-Lymphocyten stimuliert werden, die Autoren wiesen ferner nach, daß innerhalb der T-Lymphocyten einzelne, durch Dichtegradienten aufgetrennte Fraktionen (A, B, C) besser stimulierbar waren als andere Fraktionen (D,P).

Gery and Wakeman 1972 fanden heraus, daß die Stimulation der Lymphocyten durch PHA bei Zusatz von einem sogenannten "lymphocyte-activating factor" (LAF) deutlich zunahm. Dieser Faktor (LAF) wurde am effektivsten aus "adherent cells" gewonnen, die mit Lipopolysaccharid (LPS) oder PHA stimuliert worden waren. Die Autoren nahmen an, daß der Effekt im wesentlichen durch Makrophagen vermittelt wird.

Schließlich traten auch in "mixed leucocyte cultures" Interaktionen zwischen polymorphkernigen Leukocyten, Monocyten und Lymphocyten auf. Jones 1966 stellte die Hypothese auf, daß polymorphkernige Leukocyten die Transformation einiger kleiner Lymphocyten zu Makrophagen induzieren und daß diese neu gebildeten Makrophagen wiederum weitere kleine Lymphocyten zu blastoider Reaktion stimulieren.

Auf der Suche nach serumfreien Kulturbedingungen stellte sich bei eigenen Versuchen heraus, daß Erythrocyten gelegentlich schnell hämolysiert wurden und daß diese Hämolyse allein abhängig war von der Anzahl der in der Kultur anwesenden polymorphkernigen Leukocyten. (Arend et al. 1972 a) Ausgehend von diesen Beobachtungen interessierten sich die Autoren (Arend and Malchow 1972) weniger für die Erythrocytenzerstörung per se, als vielmehr für eventuelle subletale Membranveränderungen, die der Hämolyse vorausgehen. Die Autoren fanden heraus, daß die Inkubation von Erythrocyten mit polymorphkernigen Leukocyten nicht aber mit Lymphocyten zu bestimmten Blutgruppenrezeptor-

veränderungen führt. Es zeigte sich ein Verlust des N_{hu}-Rezeptors ohne einen gleichzeitigen Verlust des M_{hu}-Rezeptors und der Vicia graminea Rezeptor Aktivität. Gleichzeitig traten "neue" H- und Le- ähnliche Rezeptoren auf. Es ergaben sich Hinweise darauf, daß an diesem Phänomen Proteasen beteiligt waren, da eine Hemmung der Erscheinungen durch Proteaseinhibitoren möglich war.

Man weiß schon lange, daß polymorphkernige Leukocyten Enzyme produzieren und in den Granula speichern (de Duve 1969). Bei Kontakt mit Immunkomplexen entleeren sich diese Granula (Cohn and Fedorko 1969). Aus Membranteilen gebildete Vakuolen nehmen die Enzymkomplexe auf, es bilden sich phagocytierende Vakuolen.

Zahlreiche Autoren haben sich mit der Frage auseinandergesetzt, welche Enzyme in polymorphkernigen Leukocyten vorkommen. Nachgewiesen wurden verschiedene Proteasen, Esterasen und Neuraminidasen (Davies et al 1972, Becker and Ward 1969), Folds 1972).

Möglicherweise können diese Enzyme polymorphkerniger Leukocyten an anderen Zellen Membranveränderungen verursachen. Hinweise darauf geben die oben beschriebenen Versuche von Arend and Malchow 1972. Die von den Autoren beschriebenen durch polymorphkernige Leukocyten hervorgerufenen Blutgruppenrezeptorveränderungen an Erythrocyten konnten durch Enzyminhibitoren inhibiert werden.

Diesen Beobachtungen wurde besondere Bedeutung beigemessen, weil Membranveränderungen zusehendst mehr als entscheidender Faktor bei Wachstumsvorgängen von Zellen in Erscheinung treten. So beobachteten Hakomori et Murakami 1968 und Burger 1971, daß die Wachstumsgeschwindigkeit proliferierender Zellen abhängig ist von deren Dichte und nach Ausbildung sogenannter "monolayer" unendlich klein wird. Dieses Phänomen, daß durch die Kontakte der wachsenden Zellen zueinander vermittelt wird und von der Integrität bestimmter Membranrezeptoren abhängt, wird als Kontaktinhibition bezeichnet. Die Begrenzung der Wachstumsgeschwindigkeit proliferierender Zellen bei zunehmender Zelldichte wird als "density dependent inhibition" (DDI) bezeichnet und ist weitgehend auf die Fähigkeit der Zellen zur Kontaktinhibition zurückzuführen.

In diesem Zusammenhang spielt der Aufbau der Zellmembran, insbesondere die Zusammensetzung der Rezeptorstrukturen auf der Zelloberfläche eine wesentliche Rolle. So wiesen Hakomori und Murakami 1968 nach, daß intakte Membranrezeptorstrukturen vorwiegend das Sphingoglycolipid Hematosid und weniger die Vorstufe Lactosylceramid enthalten. Neben möglichen anderen Faktoren vermitteln diese Rezeptorstrukturen bei Berührung der Zellen untereinander die sogenannte Kontaktinhibition. Die Autoren zeigten, daß die Fähigkeit der Zellen zur Kontaktinhibition korrelliert mit dem Verhältnis der Sphingoglycolipide zueinander. Das Überwiegen von "Hematosid" gegenüber Lactosylceramid in der intakten Zellmembran ist eine Voraussetzung für die Kontaktinhibition.

Ferner korrelliert die Nicht-Agglutinierbarkeit intakter Zellen mit Lectinen mit der Begrenzung der Wachstumsgeschwindigkeit bei zunehmender Zelldichte (DDI). Diese "density dependent inhibition" intakter, nicht agglutinierbarer Zellen tritt bei zunehmender Zelldichte proliferierender Zellen auf, die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wird unendlich klein, wenn die Zellen sich untereinander berühren, sogenannte "monolayer" bilden. (Burger 1971)

Demgegenüber hat man bei Tumorzellen Membranveränderungen nachgewiesen, die in Zusammenhang mit der mangelnden Fähigkeit der Tumorzellen stellen, das Wachstum proliferierender Zellen zu begrenzen.

Hakomori und Murakami 1968 fanden heraus, daß in Tumorzellen - am Beispiel von transformierten Fibroblasten - die Zusammensetzung der Glycolipide in der Zellmembran insoweit verändert ist, daß statt Hematosid vermehrt dessen Vorstufe Lactosylceramid auftritt.

Diese Veränderung des Verhältnisses der Sphingoglycolipide zueinander korrelliert mit der Abnahme der Fähigkeit zur Kontaktinhibition. Ferner wies Burger 1971 nach, daß Tumorzellen vermehrt mit Lectinen reagieren, die Zunahme der Agglutinationsfähigkeit ist mit einer Abnahme der Fähigkeit zur Begrenzung der Wachstumsgeschwindigkeit (DDI) verbunden. Burger führt dies auf veränderte Rezeptorstrukturen in der Zellmembran zurück.

Hakomori et al. 1968 zeigten in ihren Versuchen, daß die bei transformierten Zellen auftretenden Veränderungen der Zellmembran auch durch einfache proteolytische Behandlung intakter Zellen hervorgerufen werden können.

Burger 1970 wies nach, daß durch Trypsinbehandlung die Agglutinierbarkeit vorher intakter Zellen zunahm. Diese Fähigkeit, nunmehr mit Lectinen wie z. B. Concavalin A zu reagieren, korrellierte mit dem gleichfalls nach Trypsinbehandlung auftretenden Verlust der Begrenzung der Wachstumsgeschwindigkeit. (DDI)

Burger und Noonan 1970 fanden heraus, daß durch Trypsin gespaltenes Concavalin A als Lectin mit nur einer Bindungsstelle mit Membranrezeptoren von Tumorzellen, die durch bestimmte Hexosen oder Hexosamine in Endstellung determiniert sind, reagiert. Ebenso konnten Rezeptoren in der durch Trypsin transformierten Zellmembran intakter Zellen durch gespaltenes Concavalin A besetzt werden. Die vorher vorhandene Agglutinierbarkeit der Tumorzellen und der durch Trypsin transformierten Zellen ließ sich nach der Reaktion der Membranrezeptoren mit gespaltenem Concavalin A nicht mehr nachweisen. Es gelang ein normales Zellwachstum mit intakter Kontaktinhibition und einer Begrenzung der Wachstumsgeschwindigkeit bei zunehmender Zelldichte wiederherzustellen.

Aus den an Erythrocyten bei eigenen Versuchen beobachteten Rezeptorveränderungen (Arend und Malchow 1972 b) ergab sich die Frage, ob polymorphkernige Leukocyten die Proliferation von Lymphocyten in der Kultur ebenfalls über Rezeptorveränderungen beeinflussen können. Diese Fragestellung sollte mit Hilfe nachfolgend geschilderter experimenteller Untersuchungen bearbeitet werden, gleichzeitig sollten weitere Versuche Hinweise darauf geben, in welcher Weise polymorphkernige Leukocyten die Proliferation von Lymphocyten beeinflussen. Angeregt durch die Arbeiten von Hakomori und Murakami und M. M. Burger wurde also der Fragestellung nachgegangen, inwieweit die in polymorphkernigen Leukocyten vorhandene Enzyme möglicherweise an Membranveränderungen beteiligt sind und dies die Proliferation von Lymphocyten in der Kultur verändert.

II Methode

Blutentnahme:

Gesunden Personen verschiedener Alters- und Blutgruppen wurde in sterilen Spritzen venöses Blut abgenommen, dem 20 UPS Heparin/ml zugesetzt wurden. Für einen Versuch wurden in 10 Spritzen, in welchen 0.4 ml Heparin, 3 ml Macrodex (R) und 3 ml PBS (=phosphate-buffered-saline = 0.13 M NaCL, 0.025 M Na-phosphat Puffer, pH 7.2) vorgelegt worden waren, 20 ml Blut entnommen. Es wurde während des gesamten Versuchsablaufes steril gearbeitet.

Lymphocytengewinnung:

Das leukocytenreiche Plasma wurde nach einer 2-3 stündigen Sedimentation bei 37 °C abgehoben und mit Tissue Culture Medium 199 (TC 199), Difco Laboratories, Detroit, Michigan 48201, USA 1 : 1 verdünnt. Aus dem Plasma wurden die Lymphocyten unter Ausnutzung der adhäsiven Eigenschaften der polymorphkernigen Leukocyten und Monocyten durch eine Passage über eine Nylonsäule isoliert (Havemann 1969).

Vorbereitung der Säule:

Eine Mantelsäule (Länge 40 cm, Durchmesser 1,5 cm) wurde locker mit Nylonfasern (Leucopac, Fa. Fenwal, USA) gepackt. Hierzu wurden die Leukopacfilter geöffnet und eine entsprechende Menge von Nylonfasern entnommen. Zur Entfernung von Konservierungsrückständen wurde die gestopfte Säule 10-20 min mit laufendem destilliertem Wasser gewaschen und anschließend an der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Die Säule wurde dann bei 150°C über 30 min im Heißluftschrank sterilisiert.

Der Auslauf der Nylonsäule wurde bei 800 U/min (150-170 g) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 0.7 M NH_4CL, gepuffert durch 0.5 M Tris-HCL (Trishydroxymethyl-aminomethan-HCL,pH 7.7) und mit 5 % autologem Serum resuspendiert und anschließend 10 min bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Behandlung, durch welche Erythrocytenreste zerstört werden, wurden die Lymphocyten dreimal in einer großen Menge Hank's Balanced Solution gewaschen und in Tissue Culture Medium 199 (TC 199) zu Suspensionen von 1.5×10^6 Zellen/ml aufgeschwemmt. Diese Suspensionen wurden aber nur dann weiter verwendet, wenn sie zu 96-99 % aus mononucleären Zellen bestanden.

Isolierung polymorphkerniger Leukocyten (PKL):

Die polymorphkernigen Leukocyten wurden aus der Nylonwatte mit Hilfe eines auf 2-4°C abgekühlten Elutionsmittels folgender Zusammensetzung eluiert: 6×10^{-4}M EDTA (Aethylendiamin-tetraessigsäure) enthaltend 6×10^{-3} D-Glucose, 1.4×10^{-2}M NaCL, 5×10^{-3}M KCL, 5×10^{-4}M Na_2HPO_4, 4×10^{-3}M KH_2PO_4, und zur Einstellung des pH-Wertes von 6.25 etwa 4×10^{-3}M $NaHCO_3$. Nach der Elution wurden die polymorphkernigen Leukocyten dreimal in einer großen Menge Hank's Balanced Solution gewaschen und dann in TC 199 zu Suspensionen verschiedener Konzentrationen 2.5×10^5 - 7.5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Suspensionen wurden jedoch nur dann weiter verwendet, wenn sie zu 96-99 % aus polymorphkernigen Leukocyten bestanden.

Ansatz der Lymphocytenkulturen:

2 ml Gesamtsuspension einer Kultur enthielten:

1 ml Lymphocyten (enthaltend $1,5 \times 10^6$ Lymphocyten)

0.2 ml polymorphkernige Leukocyten (enthaltend 5×10^4 - 1.5×10^6 Zellen)

0.1 ml PHA (enthaltend 12.5 ng Phytohämagglutinin P aus Phaseolus vulgaris, Difco Laboratories Michigan 18201 USA)

0.5 ml TC 199 (bzw. sonstige Zusätze)
dem verwendeten TC 199 wurden 1×10^6 TU Penicillin/l und 1 g Steptomycin/l zugesetzt.

Diese gemischten Kulturen wurden in sterilen Röhrchen mit steriler Aluminiumfolie verschlossen in einem Winkel von 20° geneigt unter konstanter O_2 - und CO_2-Zufuhr und Luftfeuchtigkeit über 72h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Aufarbeitung und Auswertung der Lymphocytenkulturen:

Übereinstimmungsgemäß kann die Desoxyribonucleinsäure (DNS) Synthese als Maß für die Proliferation von Zellen herangezogen werden. Nach der Inkubation über 72h wurde jede 2 ml Kultur mit 2 uC H^3 Thymidin (spezifische Aktivität: 6.7 C/mM) gelöst in 0.1 ml 0.15 M NaCl versetzt. Die Inkubation wurde weitere 4 h fortgesetzt. Danach wurden die Kulturen auf 4 °C abgekühlt, einmal mit 4 ml Hank's Balanced Solution bei 800 U/min (150-170 g) und das Sediment mit 2 ml Eisessig-Alkohol (Verhältnis 1 :3) bei 4°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden bei 2000 U/min abgeschleudert und das Sediment unter 70 %igem Äthylalkohol bei 4°C aufbewahrt.

Die Extraktion der Desoxyribonucleinsäure erfolgte nach bekannten Methoden (Havemann, K. 1969), ebenso die Bestimmung der Aktivität der extrahierten DNS. Die Berechnungen der Versuche basieren auf c.p.m. (counts per minute) pro Kultur.

Folgende Versuchsansätze wurden durchgeführt:

1. Einfluß polymorphkerniger Leukocyten auf die Proliferation von Lymphocyten.

Die H^3 Thymidineinbauraten der in Gegenwart von polymorphkernigen Leukocyten kultivierten Lymphocytenkulturen wurden mit den Einbauraten von Kulturen verglichen, die nur Lymphocyten enthielten, ferner mit den Einbauraten von Kulturen, die nur polymorphkernige Leukocyten aber keine Lymphocyten enthielten. Es ist zwar bekannt, daß polymorphkernige Leukocyten allein keine nennenswerte DNS-Synthese entwickeln; derartige Vergleichskulturen sollten dazu dienen, einmal die durch die Versuchsbedingungen oder durch Verunreinigungen hervorgerufene H^3 Thymidin-Inkorporation zu bestimmen oder zum anderen die Restaktivität mononucleärer Zellen, die in den Granulocytensuspensionen noch vorhanden waren.

Ferner wurden verschiedene Konzentrationen polymorphkerniger Leukocyten den Lymphocytenkulturen zugesetzt bzw. isoliert kultiviert (Konzentrationen: 50 000 - 1.5×10^6 PKL/Kultur). Es wurde die H^3 Thymidineinbaurate von Kulturen ohne polymorphkernige Leukocyten mit den Einbauraten der Kulturen mit steigenden Konzentrationen polymorphkerniger Leukocyten verglichen, ferner wurde auch die H^3 Thymidineinbauraten solcher Kulturen miteinander verglichen, die steigende Mengen polymorphkerniger Leukocyten enthielten.

2. Einfluß steigender Mengen polymorphkerniger Leukocyten im Vergleich mit steigenden Mengen von Lymphocyten auf die Proliferation von Lymphocyten

Jeder Kultur wurden 1.5×10^6 Lymphocyten, 0,1 ml PHA und 0.2 ml autologes Serum vorgelegt und abwechselnd gleiche Konzentrationen an Lymphocyten oder polymorphkernigen Leukocyten zugesetzt. (Konzentrationen: 50 000 - 1.5×10^6 Lymphocyten bzw. PKL pro Kultur).

3. Dichtestudien

Um auszuschließen, daß die in Gegenwart von polymorphkernigen Leukocyten beobachteten Effekte allein auf die veränderte Zelldichte zurückzuführen ist, wurden folgende Versuche Untersuchungen angestellt. Es wurden Kulturen steigender Lymphocytenkonzentrationen angelegt (Konzentration der Lymphocyten 185000 - 3 x 10^6 Lymphocyten/Kultur). Hierbei sollte kontrolliert werden, ob bei den von uns gewählten Lymphocytenkonzentrationen Sättigungserscheinungen der H^3 Thymidineinbaurate bei höheren Konzentrationen auftraten. Ferner sollte durch Versuch mit Kulturen, die wie oben steigende Mengen Lymphocyten enthielten, also eine unterschiedliche Zelldichte aufwiesen, denen aber zusätzliche jeweils eine konstante Menge polymorphkerniger Leukocyten zugesetzt wurden, überprüft werden, ob der Einfluß der polymorphkernigen Leukocyten auf die H^3 Thymidineinbaurate von Lymphocytenkulturen ein von der Zelldichte unabhängiges Prinzip darstellt. Die in dem jeweiligen Versuch konstante Zahl der zugesetzten polymorphkernigen Leukocyten wurde nur bei den verschiedenen Versuchen variiert. (Es wurden in je einem Versuch 100 000, 300 000 oder 500 000 PKL/Kultur zugesetzt.)

4. Einfluß der Ammoniumchlorid-Behandlung

Der Einfluß der NH_4Cl Behandlung auf die Proliferation der Lymphocytenkulturen wurde überprüft. Wir legten Versuche an, bei denen auch die polymorphkernigen Leukocyten nach der Eluierung aus der Nylonsäule in gleicher Weise wie die Lymphocyten mit NH_4Cl behandelt wurden. Die so behandelten polymorphkernigen Leukocyten wurden Lymphocytenkulturen zugesetzt und die H^3 Thymidineinbaurate dieser Kulturen wurde mit der Einbaurate von Kulturen verglichen, die nur Lymphocyten enthielten.

5. Einfluß von Serumfaktoren

Der Einfluß von Serumfaktoren auf die Proliferation von Lymphocytenkulturen wurde überprüft:

Wir führten Versuche durch, bei denen Lymphocytenkulturen unterschiedliche Mengen autologen Serums zugesetzt wurden (0.05 - 0.5 ml Serum/Kultur).

Ferner wurden Versuche angesetzt, bei denen je 0.2 ml polymorphkernige Leukocyten (enthaltend 300 000 - 1 x 10^6 PKL) mit 0,2 ml Serum oder 0,2 ml TC 199 vorinkubiert wurden. Die Dauer der Vorinkubation betrug 1 - 22 h). Nach der Vorinkubation wurden die polymorphkernigen Leukocyten bei 2000 U/min abzentrifugiert und nur die Überstände der Vorinkubierten Suspensionen weiterverwendet. 0.4 ml Überstand, entsprechend der Wirkung von 0.2 ml PKL auf 0.2 ml TC 199 bzw. auf 0.2 ml Serum, wurden Lymphocytenkulturen zugesetzt (enthaltend 1.5 x 10^6 Lymphocyten/Kultur) Den nicht mit Serum vorinkubierten Kulturen wurden 0.2 ml Serum zugesetzt. Die H^3 Thymidineinbaurate von Lymphocytenkulturen, die mit Überständen von Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten und Serum bzw. TC 199 kultiviert wurden, wurde verglichen mit der Einbaurate von Lymphocytenkulturen, denen die polymorphkernigen Leukocyten direkt zugesetzt wurden.

6. Versuche mit Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten

a) Polymorphkernige Leukocyten in Suspensionen unterschiedlicher Konzentration wurden ultraschallbehandelt, die Homogenate resuspendiert und dann den Lymphocytenkulturen zugesetzt. Für Vergleichszwecke wurden Kulturen präpariert, die ausschließlich aus Lymphocyten, bzw. aus Lymphocyten mit intakten polymorphkernigen Leukocyten bestanden.

b) Die Wirkung von Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten, die 30 min bei 56°C inkubiert waren, wurde mit der Wirkung von unbehandelten Homogenaten verglichen.

c) Homogenate polymorphkerniger Leukocyten wurden über 1h in einer Kühl-Vakuum-Zentrifuge bei 130 000 x g zentrifugiert, die Wirkung der Überstand- und der Sedimentlösung auf die Lymphocytenproliferation wurde mit der Wirkung der nicht weiter behandelten Ultraschall-Homogenate verglichen.

7. Wirkung von Enzymen und Enzyminhibitoren

a) Stimulation von Lymphocytenkulturen durch Trypsin

$1,5 \times 10^6$ Lymphocyten/Kultur wurden 10 - 30 min mit verschiedenen Mengen Trypsin (Trypsin Serva GmbH, 69 Heidelberg, BRD, Trypsin 1:250 = 250 NF Einheiten/mg.) inkubiert. Den Kulturen wurden 0.01 - 2 ml Trypsin zugesetzt, enthaltend 0.5 - 100 µg Trypsin.

b) Stimulation durch Neuraminidase

1.5×10^6 Lymphocyten/Kultur wurden mit 10-50 IE Neuraminidase/Kultur und 0.2 ml Serum mit oder ohne 0.1 ml PHA inkubiert. (Neuraminidase aus Vibrio Cholerae, Behring-Werke AG, Marburg, BRD, 500 IE/ml)

c) Inhibition durch α-1-Antitrypsin[1)]

Den mit polymorphkernigen Leukocyten stimulierten Lymphocytenkulturen wurden 20 - 750 µg α-1-Antitrypsin/Kultur zugesetzt, um die Wirkung dieser Antiprotease auf die Proliferation zu testen. (α-1-Antitrypsin-Aktivität 220 IE/µg.)

d) Inhibition durch Aprotinin[2)]

Den durch polymorphkernige Leukocyten stimulierten Lymphocytenkulturen wurden 10 - 30 000 KIE Aprotinin/Kultur zugesetzt, um die Wirkung dieses Protease-neutralisierenden Polypeptides auf die durch polymorphkernige Leukocyten induzierte Lymphocytenproliferation zu testen. (Aprotinin-Aktivität 6 600 KIE/µg.)

---

1) α-1-Antitrypsin wurde uns von Dr. Heimburger, Behringwerke AG, 355 Marburg, BRD, zur Verfügung gestellt.

2) Kristallines Aprotinin wurde uns von Prof. Dr. Keller, Bayer AG, 509 Leverkusen, BRD, zur Verfügung gestellt.

e) Inhibition durch C-1-Esterase-Inhibitor (α-Neuramino-Glycoprotein)[1)]

Den durch polymorphkernige Leukocyten (200 000 PKL/Kultur) stimulierten Lymphocytenkulturen wurden 15 - 230 µg C-1-Esterase-Inhibitor /ml zugesetzt, um den Einfluß dieses spezifischen Inhibitors auf die durch polymorphkernige Leukocyten induzierte Lymphocytenproliferation zu testen. (C-1-Esterase-Inhibitor-Aktivität 128 IE / µg.)

8. Spezifische Lymphocytenproliferation durch Tuberkulin

Die Wirkung polymorphkerniger Leukocyten auf die tuberkulininduzierte spezifische Lymphocytenproliferation sollte dargestellt werden.

Von Tuberkulin-Test-positiven Personen wurden Lymphocyten und polymorphkernige Leukocyten gewonnen. Den Lymphocytenkulturen wurden - ebenso wie bei den durch PHA stimulierten Lymphocytenkulturen - steigende Mengen polymorphkerniger Leukocyten zugesetzt. Zur Wachstumsinduktion wurden 0,1 ml Tuberkulin, enthaltend 20 µg Alttuberkulin gelöst in TC 199, pro Kultur zugesetzt. (Tuberkulin GT, Farbwerke Hoechst AG, 623 Frankfurt/Main-Hoechst, BRD, Tuberkulin GT Stärke 1000 (enthaltend 0,2 mg Tuberkulin = 20 TE) ≙ 1 : 10 Alt-Tuberkulin.) Die Inkubationszeit für diese Kulturen betrug 7 Tage. Dann erfolgte die Weiterverarbeitung wie bei den übrigen Kulturen.

---

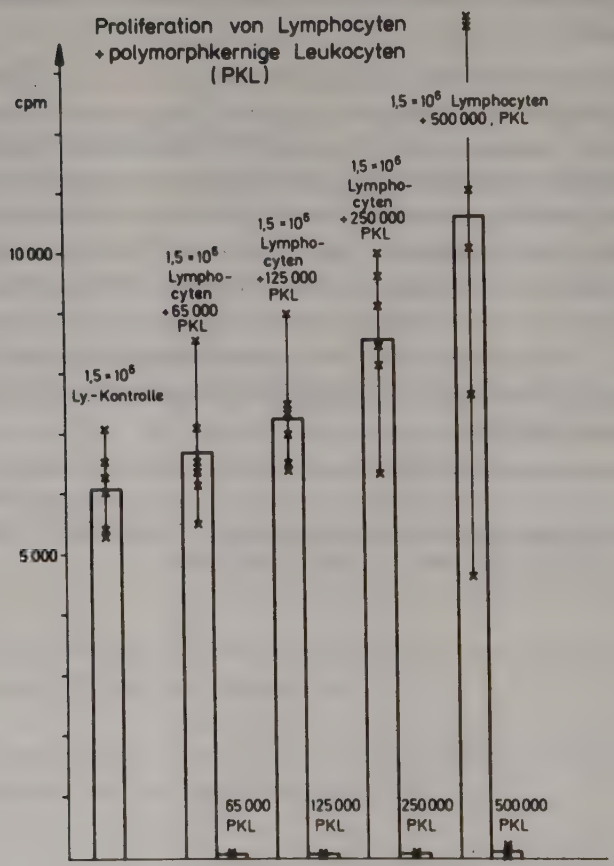
1) C-1-Esterase-Inhibitor wurde uns von Dr. Heimburger, Behringwerke AG, 355 Marburg, BRD, zur Verfügung gestellt.

III Ergebnisse:

1. Einfluß polymorphkerniger Leukocyten auf die mitogeninduzierte Lymphocytenproliferation

Vergleiche zwischen den durch polymorphkernige Leukocyten stimulierten PHA-Lymphocyten-Kulturen und den Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten, ergeben eine deutliche Steigerung der Proliferation - dargestellt an der H^3 Thymidineinbaurate - bei den durch polymorphkernige Leukocyten stimulierten Kulturen.

Abb. 1



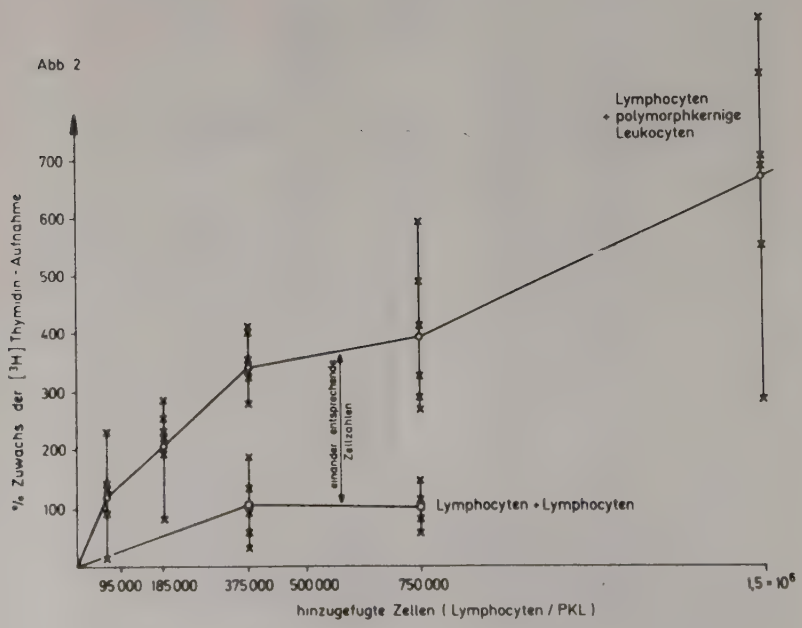
Diese Steigerung der H^3 Thymidineinbaurate (siehe Abb. 1) ist bereits bei einem Zusatz von ca. 5 % polymorphkerniger Leukocyten (65 000 PKL/Kultur) vorhanden. Ab ca. 8 % polymorphkerniger Leukocyten läßt sich die Steigerung der Proliferation auch significant nachweisen (siehe Tab. I).

Diese Steigerung der Lymphocytenproliferation ist nicht durch einfache Addition der Aktivität polymorphkerniger Leukocyten zur Aktivität der Lymphocyten zu verstehen, da die einfache Addition noch nicht einmal ein Zwanzigstel der Proliferationssteigerung ausmacht. Der Vergleich zwischen Kulturen, die nur polymorphkernige Leukocyten enthielten, mit den Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten, zeigt, daß polymorphkernige Leukocyten allein auf Stimulation mit PHA keine nennenswerte DNS-Synthese entwickeln (siehe Abb. 1, Tab. I). Ferner wird deutlich, daß auch die Restaktivität eventuell noch vorhandener mononucleärer Zellen in den Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten gering ist.

2. <u>Einfluß von zugesetzten polymorphkernigen Leukocyten im Vergleich zu zugesetzten Lymphocyten</u>

Lymphocytenkulturen (1.5 x 10^6 Lymphocyten/Kultur) wurden steigende Mengen polymorphkerniger Leukocyten zugesetzt und diese mit Kulturen verglichen, denen entsprechend steigende Mengen weiterer Lymphocyten zugesetzt wurden. Diese Versuche zeigen, daß die durch polymorphkernige Leukocyten hervorgerufenen Proliferationssteigerungen weit über den durch zusätzliche Lymphocyten hervorgerufenen Proliferationssteigerungen liegen.

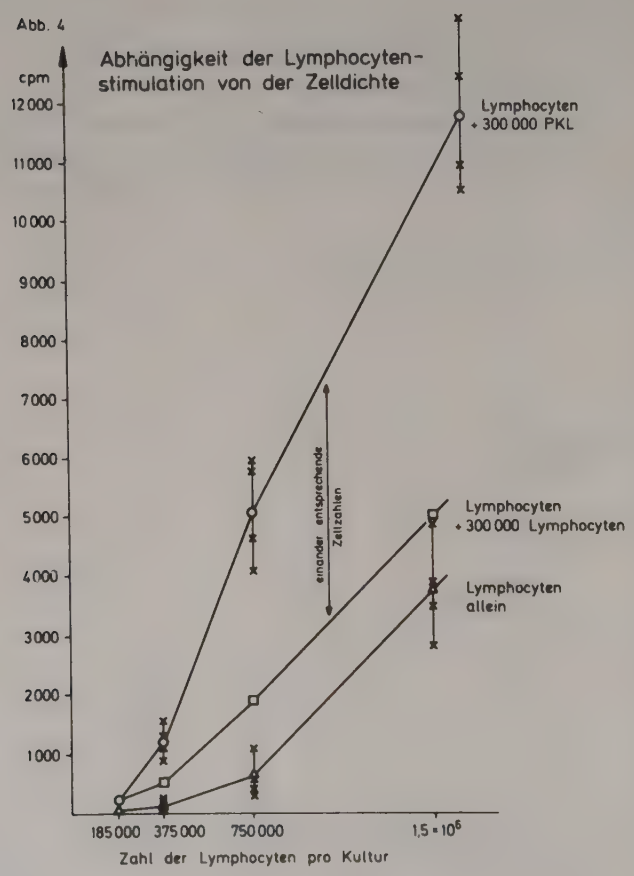
Ein Zusatz von 1.5 x 10^6 weiteren Lymphocyten zu den vorgegebenen 1.5 x 10^6 Lymphocyten ergab eine maximale Proliferationssteigerung um 99 %. Dies entspricht ungefähr der Addition. Ein Zusatz der gleichen Menge polymorphkerniger Leukocyten bewirkt jedoch eine Proliferationssteigerung um etwa das 8-fache (siehe Abb. 2).



Hierbei muß berücksichtigt werden, daß der Zusatz von weiteren Lymphocyten ja den Zusatz von weiteren proliferationsfähigen Zellen bedeutet, die polymorphkernigen Leukocyten aber, wie schon oben dargestellt, keine Proliferation und keinen wesentlichen H^3 Thymidineinbau aufweisen (siehe auch Tab. II).

3. Dichtestudien

Versuche zur Zelldichte zeigen deutlich, welchen Einfluß die Zelldichte auf die Lymphocytenproliferation in vitro hat. Bei steigender Lymphocytendichte/Kultur (von 185 000 - 3 x 10^6 Lymphocyten/Kultur) zeigte sich eine Steigerung der Thymidineinbaurate. Eine Sättigung ließ sich bei unseren Versuchen bei Konzentrationen bis 3 x 10^6 Lymphocyten/Kultur nicht nachweisen.

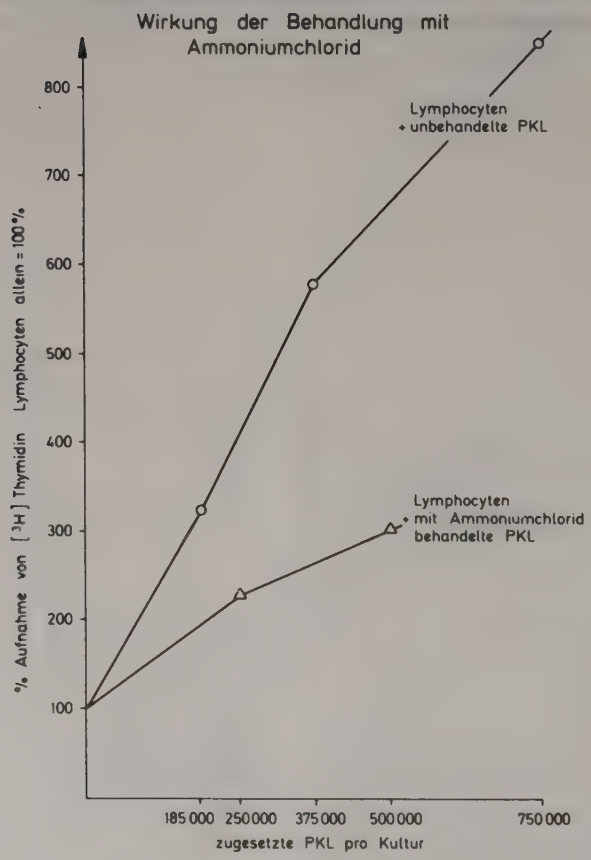


Gleichzeitig konnten wir in diesen Versuchen jedoch klar herausstellen, daß die Wirkung der polymorphkernigen Leukocyten einen von der Zelldichte unabhängigen zusätzlichen Effekt darstellt. Konstante Mengen polymorphkerniger Leukocyten pro Versuch riefen bei Lymphocytenkulturen unterschiedlicher Zelldichte (185 000 - 3 x 10^6 Lymphocyten/Kultur) immer einen deutlichen proliferationssteigernden Effekt hervor (siehe Abb. 4 u. Tab. IV). Diese Wirkung der polymorphkernigen Leukocyten läßt sich somit nicht durch eine zunehmende Zelldichte erklären, für die proliferationsfördernde Wirkung der polymorphkernigen Leukocyten ist die Zellqualität von entscheidender Bedeutung.

4. Einfluß der Ammoniumchloridbehandlung

Die H^3 Thymidineinbaurate von Lymphocytenkulturen, denen unbehandelte polymorphkernige Leukocyten zugesetzt wurden, wurde verglichen mit der Einbaurate von Lymphocytenkulturen, denen polymorphkernige Leukocyten zugesetzt wurden, die zuvor in gleicher Weise wie alle Lymphocyten mit NH_4CI behandelt wurden. Unbehandelte polymorphkernige Leukocyten weisen einen höheren proliferationsfördernden Effekt auf als mit NH_4CI behandelte polymorphkernige Leukocyten.

Abb. 3



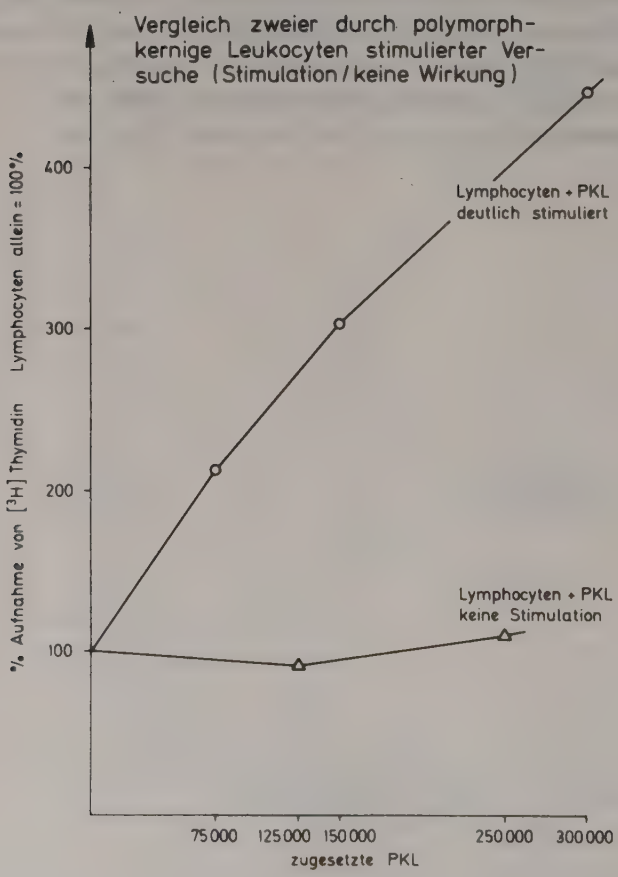
Nimmt man aus der Gruppe der Versuche mit unbehandelten polymorphkernigen Leukocyten und aus der Gruppe mit behandelten polymorphkernigen Leukocyten diejenigen heraus, die den höchsten proliferationsfördernden Effekt zeigen, so wird deutlich, daß das proliferationsfördernde Prinzip der polymorphkernigen Leukocyten durch die Ammoniumchloridbehandlung nicht aufgehoben, aber doch eingeschränkt wird. (siehe Abb. 3 u. Tab. III)

In einigen Versuchen jedoch weisen Kulturen, denen behandelte polymorphkernige Leukocyten zugesetzt wurden, eine höhere H^3 Thymidineinbaurate auf als Kulturen, die mit unbehandelten polymorphkernigen Leukocyten versetzt wurden. Insgesamt kann die Bedeutung der Ammoniumchloridbehandlung für unsere Versuche eingeschränkt werden, die Behandlung mit Ammoniumchlorid vermindert zwar den proliferationsfördernden Effekt der polymorphkernigen Leukocyten, hebt ihn jedoch nicht auf.

Weitere Ergebnisse, die unter den bisher genannten Versuchsbedingungen gewonnen wurden:

Bei den meisten Versuchen, in denen polymorphkernige Leukocyten Lymphocytenkulturen zugesetzt wurden, zeigte sich ein deutlicher proliferationsfördernder Effekt der polymorphkernigen Leukocyten. In einigen wenigen Versuchen jedoch (siehe auch Tab. VI u. Abb. 7) riefen polymorphkernige Leukocyten nur einen geringfügigen oder auch gar keinen proliferationsfördernden Effekt hervor. (siehe Abb. 5 und Tab. V)

Abb 5



In einigen Versuchen beobachteten wir bei hohen Konzentrationen polymorphkerniger Leukocyten einen inhibierenden Effekt auf die Lymphocytenproliferation. Eine Hemmung der Lymphocytenproliferation trat aber nur selten auf significantem Niveau auf (siehe Tab. VI). Die Inhibition der reichte nie über 25 % der Lymphocytenproliferation ohne Zusatz polymorphkerniger Leukocyten hinaus.

Die proliferationsfördernde Wirkung der polymorphkernigen Leukocyten lag auf signifikantem Niveau zwischen 120 % und 850 % der ursprünglichen Lymphocytenproliferation (siehe Tab. VI).

Bei einigen Versuchen stellte sich heraus, daß es für die Kulturen eine gewisse Sättigung der H^3 Thymidineinbaurate gab. Versuche, bei denen bereits die Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten, eine hohe Einbaurate aufwiesen, wurden durch polymorphkernige Leukocyten nicht mehr in sehr großem Ausmaß stimuliert.

Bei der Auswertung der Versuche zeigte sich, daß die Streuung der Werte der H^3 Thymidineinbaurate in den einzelnen Kulturen eines Versuchsansatzes relativ hoch war. (siehe Abb. 6)

Bei den verschiedenen Versuchen stellte sich heraus, daß die Streuung der Mittelwerte für die H^3 Thymidineinbaurate der Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten ebenfalls groß war.

Aus oben genannten Gründen mußten die Proliferationssteigerungen in eine relative Darstellung gebracht werden, nur so konnten die verschiedenen Versuche überhaupt miteinander verglichen werden (siehe Abb. 6). Eine Auswertung anhand der Absolutwerte der H^3 Thymidineinbaurate erschien uns nicht sinnvoll (siehe Abb. 6).

Abb. 6

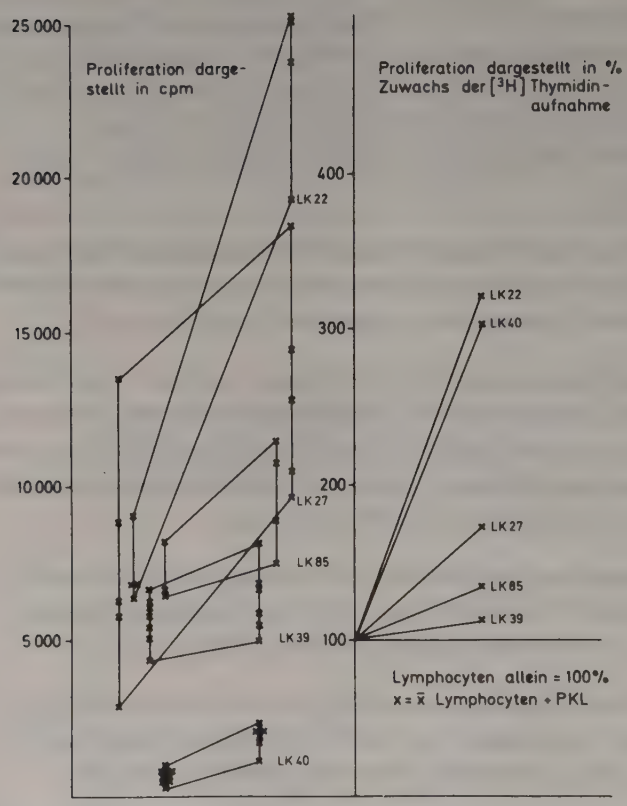


Abb. 6 <u>linke Bildhälfte:</u>
Darstellung einiger Versuche anhand der H^3 Thymidineinbaurate. Je ein Versuch wurde durch ein Viereck dargestellt.
links: Streuung der Einzelwerte der Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten.
rechts: Streuung der Einzelwerte der Kulturen, die Lymphocyten und polymorphkernige Leukocyten enthielten.

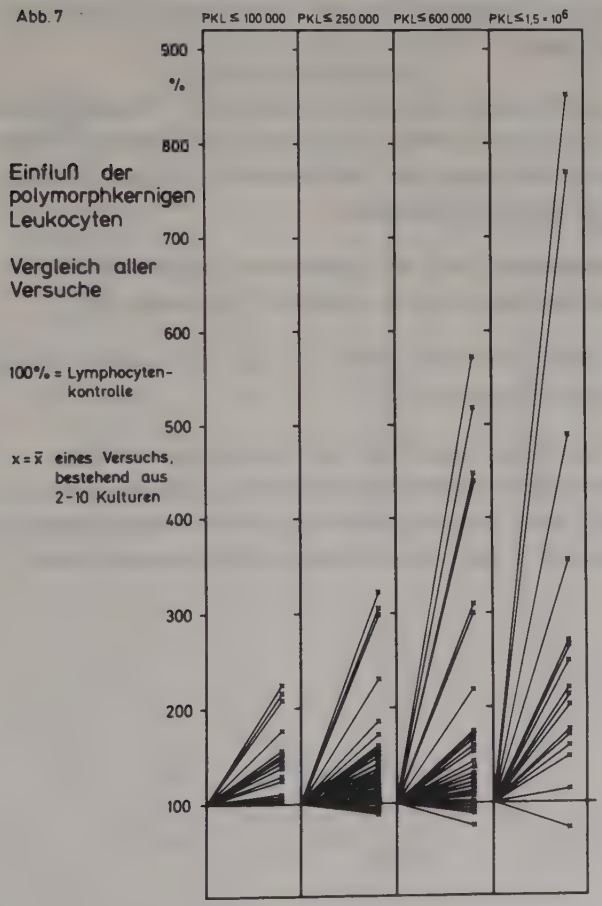
<u>rechte Bildhälfte:</u>
Darstellung derselben Versuche in % Zuwachs der H^3 Thymidineinbaurate. Vergleich der Kulturen mit polymorphkernigen Leukocyten gegenüber den Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten.

Zusammenfassende Darstellung aller Versuche, welche die Proliferationsförderung von Lymphocytenkulturen durch polymorphkernige Leukocyten betreffen.

Eine Zusammenfassung der Originaldaten, der statistischen Auswertung und der relativen Proliferationssteigerungsraten liegt in Tabelle VI vor.

Die statistische Auswertung wurde nach dem U-Test nach Mann und Whitney (Rangtest) 1947 durchgeführt. Nach diesem Test wurden auch die Signifikanzschranken in Tab. VI angegeben.

Abb. 7



Einen zusammenfassenden Überblick über die Ergebnisse liefert Abb. 7. Aus oben genannten Gründen wurde eine Darstellung der relativen Proliferationssteigerung gewählt. Die 100 %-Basis wurde durch den arithmetischen Mittelwert der Kulturen eines Versuches repräsentiert, die nur Lymphocyten enthielten. Die Mittelwerte aller Kulturen eines Versuchs, die Lymphocyten und polymorphkernige Leukocyten enthielten wurden in Prozentwerten, bezogen auf die 100 % - Basis dargestellt.

Die zusammenfassende Darstellung aller Versuche (Abb. 7 u. Tab. VI) zeigt:

a) polymorphkernige Leukocyten können die H^3 Thymidineinbaurate von mitogen (PHA) - stimulierten Lymphocytenkulturen erheblich steigern, die Steigerungsrate variiert jedoch bei den einzelnen Versuchen.

b) mit zunehmender Zahl der zugesetzten polymorphkernigen Leukocyten nimmt auch die maximale Steigerung zu.

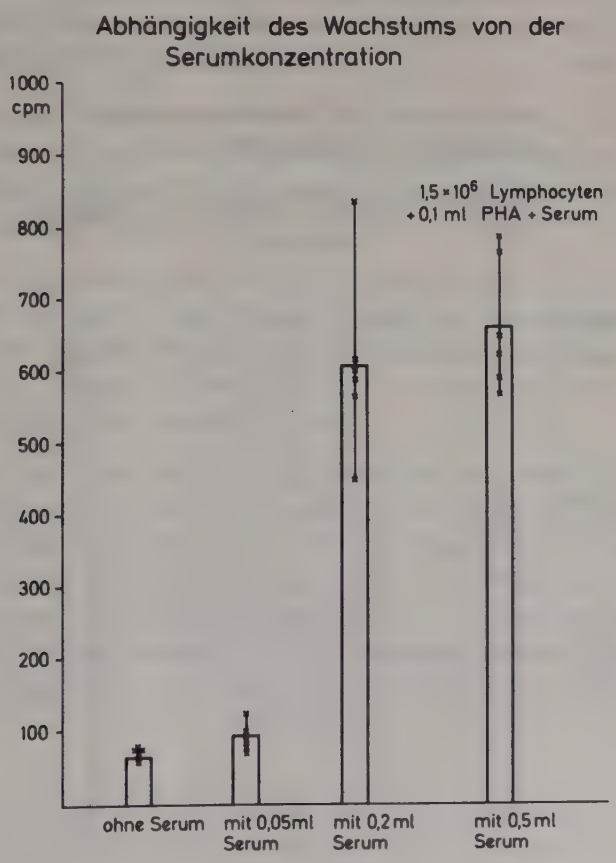
c) Eine Inhibition tritt selten auf und stellt sich nicht in erheblichem Ausmaß ein.

d) Die Ergebnisse lassen sich als eine Kurvenschar von e-Funktionen möglicherweise verstehen, auch die unterschiedlichen Steigerungsraten bei den einzelnen Versuchen würden durch eine solche Interpretation verständlich.

5. Einfluß von Serum

Bei unseren Versuchen wurden den Lymphocyten-Kulturen immer 0.2 ml autologes Serum zugesetzt (dies entspricht einen Zusatz von 10 %). Die Versuche, in denen Lymphocytenkulturen unterschiedliche Mengen autologen Serum zugesetzt wurden dienten der Überprüfung des Serumeinflusses aus die Lymphocytenproliferation.

Abb. 8

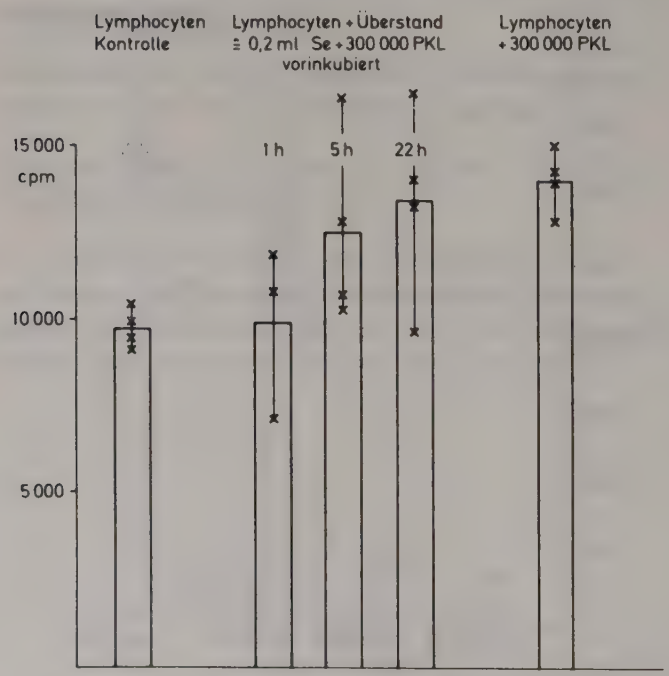


Diese Versuche zeigen, daß die Proliferationsfähigkeit der Lymphocytenkulturen ab ca. 10 % Serumzugabe deutlich erhöht ist. Eine weitere Erhöhung des Serumanteils der Kulturen hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Proliferation. (siehe Abb. 8 u. Tab. VII)

Serumeinflüsse spielen auch bei der durch polymorphkernige Leukocyten stimulierten Lymphocytenproliferation eine Rolle. Dies zeigen die Versuche, in den polymorphkernige Leukocyten mit Serum vorinkubiert wurden und dann nur die Überstände den PHA-stimulierten Lymphocytenkulturen zugesetzt wurden.

Abb. 9

Wirkung von mit polymorphkernigen Leukocyten vorinkubiertem Serum



In Abb. 9 (siehe auch Tab. VIII) ist ein Versuch dargestellt, wo einerseits polymorphkernige Leukocyten (300 000 PKL) den Lymphocytenkulturen direkt zur Inkubation zugesetzt wurden, andererseits den Lymphocytenkulturen die Überstände von mit Serum vorinkubierten Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten zugesetzt wurden. Vorinkubiert wurden 0.2 ml Serum mit 0.2 ml polymorphkerniger Leukocyten (≙ 300 000 PKL). Nach 1h - 22 h Vorinkubation wurden diese Suspensionen abzentrifugiert und 0.4 ml Überstand den Lymphocytenkulturen zur Inkubation zugesetzt.

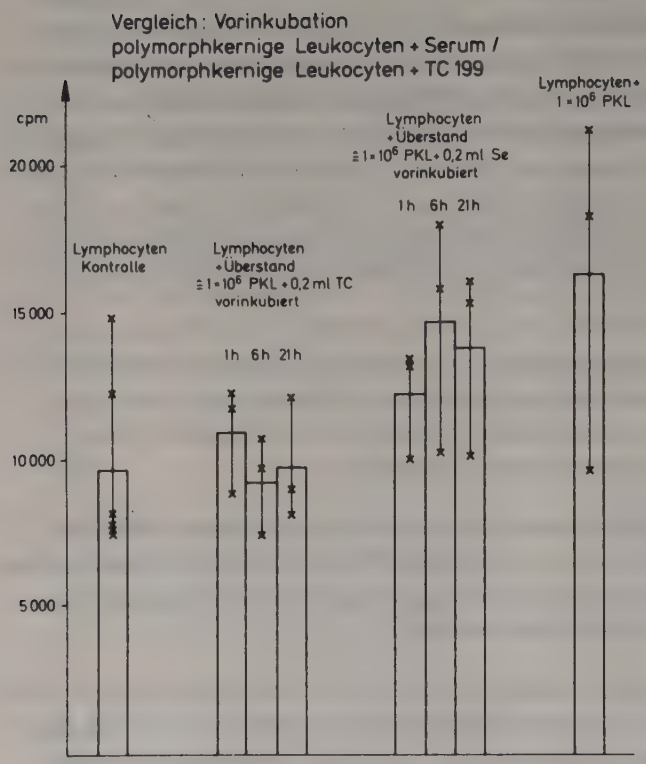
Die Versuchsergebnisse zeigen, daß auch die Überstände der mit polymorphkernigen Leukocyten vorinkubierten Seren einen proliferationsfördernden Effekt auf die mitogeninduzierte Lymphocytenproliferation ausüben.

Der proliferationsfördernde Effekt steigt mit der Dauer der Vorinkubation, ist aber geringer als der proliferationsfördernde Effekt, der durch den direkten Zusatz polymorphkerniger Leukocyten erreicht werden konnte.

Einen weiteren Aspekt zum Einfluß von Serumfaktoren liefern die Versuche, in denen polymorphkernige Leukocyten mit Serum oder mit TC 199, als dem Milieu, in dem wir Lymphocytenkulturen ansetzten, vorinkubiert wurden und dann die Überstände den Lymphocytenkulturen zugesetzt wurden.

Abb. 10 (siehe auch Tab. IX) zeigt einen solchen Versuch. Vorinkubiert wurden je 0.2 ml Serum oder TC 199 mit 0.2 ml polymorphkerniger Leukocyten (≙ 1×10^6 PKL). Nach 1 h - 21 h Vorinkubation wurden die Suspensionen abzentrifugiert und 0.4 ml Überstand den Lymphocytenkulturen zugesetzt. Zum Vergleich wurden auch Kulturen angelegt, denen polymorphkernige Leukocyten (1×10^6 PKL) direkt zur Inkubation zugesetzt wurden.

Abb 10



Die Versuchsergebnisse zeigen, daß das Medium TC 199 keinen Einfluß auf das proliferationsfördernde Prinzip hat, daß die Interaktion mit Serum bei der Vorinkubation aber, wie auch oben gezeigt, eine Rolle bei der proliferationsfördernde Wirkung polymorphkerniger Leukocyten spielt. Die direkte Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation wird bei dem abgebildeten Versuch nicht so deutlich. Anhand der vorliegenden Versuche kann festgestellt werden, daß Serumfaktoren auch bei der durch polymorphkernige Leukocyten stimulierten mitogeninduzierten Lymphocytenproliferation eine wesentliche Rolle spielen.

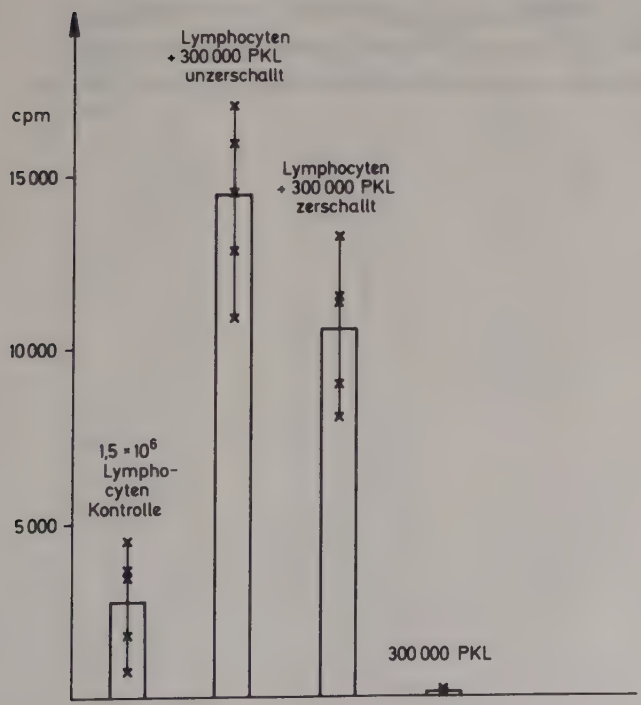
6. <u>Einfluß von homogenaten polymorphkerniger Leukocyten auf die mitogeninduzierte Lymphoproliferation</u>

a) Einfluß von durch Ultraschall homogenisierten Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten.

Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten wurden Ultraschallbehandelt, die Homogenate resuspendiertert und dann den Lymphocytenkulturen zugesetzt. Zum Vergleich wurden Kulturen angelegt, die nur polymorphkernige Leukocyten enthielten, Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten und Kulturen, denen unzerschallte polymorphkernige Leukocyten zugesetzt wurden.

Abb. 11

Vergleich: Stimulation durch polymorphkernige Leukocyten zerschallt / unzerschallt



Diese Versuche zeigen unterschiedliche Ergebnisse:

Es liegen Versuche vor (siehe Abb. 11 und Tab. X) die zeigen, daß Homogenate polymorphkerniger Leukocyten durchaus einen proliferationsfördernden Effekt ausüben können. Hierbei ist jedoch der proliferationsfördernde Effekt von Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten geringer als der Effekt, der durch entsprechende Mengen intakter polymorphkerniger Leukocyten hervorgerufen wird.

Im Gegensatz zu den Versuchen, bei denen Homogenate polymorphkerniger Leukocyten eine, wenn auch verringerte, proliferationsfördernde Wirkung zeigen, stehen Versuche, bei denen Homogenate polymorphkerniger Leukocyten keinen Stimulationseffekt bewirkten. Im Vergleich zu den Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten, blieben die H^3-Thymidineinbauraten unverändert. (siehe auch Abb. 12 u. Tab. XI).

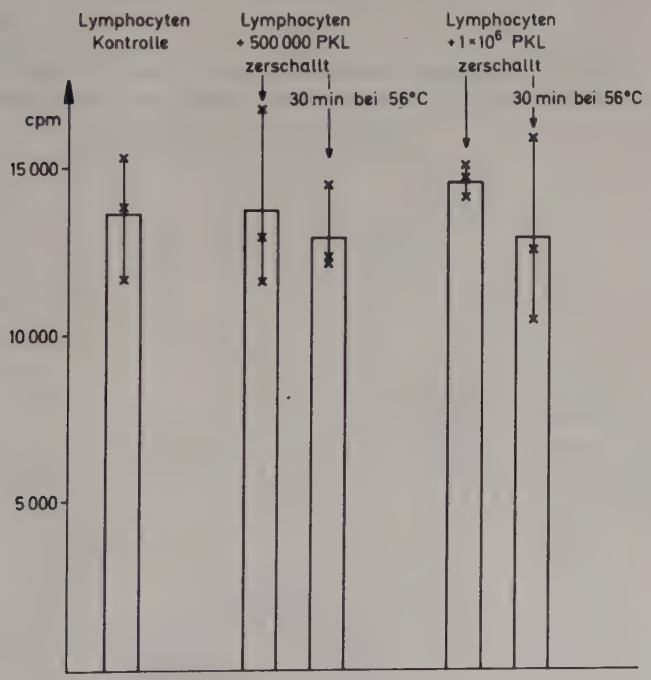
Ferner liegen Versuchsergebnisse vor, bei denen Homogenate polymorphkerniger Leukocyten einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von Lymphocytenkulturen ausübten (siehe Abb. 13 u. Tab. XII).

b) Einfluß von vorinkubierten Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten

Die Versuche, bei denen durch Ultraschall gewonnene Homogenate polymorphkerniger Leukocyten auf die Thomostabilität (durch Inkubation bei 56 °C) des proliferationsfördernden Prinzips überprüft wurden, zeigen, daß nach Inkubation bei 56°C Homogenate polymorphkerniger Leukocyten keinen proliferationsfördernden Einfluß mehr auf Lymphocytenkulturen ausüben.

Abb. 12

Wirkung von zerschallten polymorphkernigen Leukocyten aktiv / inaktiv (30' bei 56°C)



Der dargestellte Versuch (Abb. 12 u. Tab. XI) zeigt, daß vorinkubierte Homogenate polymorphkerniger Leukocyten keinen proliferationsfördernden Effekt aufweisen. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß bei dem dargestellten Versuch auch die Homogenate polymorphkerniger Leukocyten, die nicht bei 56°C vorinkubiert wurden, keinen proliferationsfördernden Effekt zeigen. Es liegen jedoch auch Versuche vor, bei denen, wie in Abb. 11 dargestellt, Homogenate polymorphkerniger Leukocyten einen proliferationsfördernden Effekt hervorrufen, dieser Effekt aber nach Inkubation bei 56°C verloren geht.

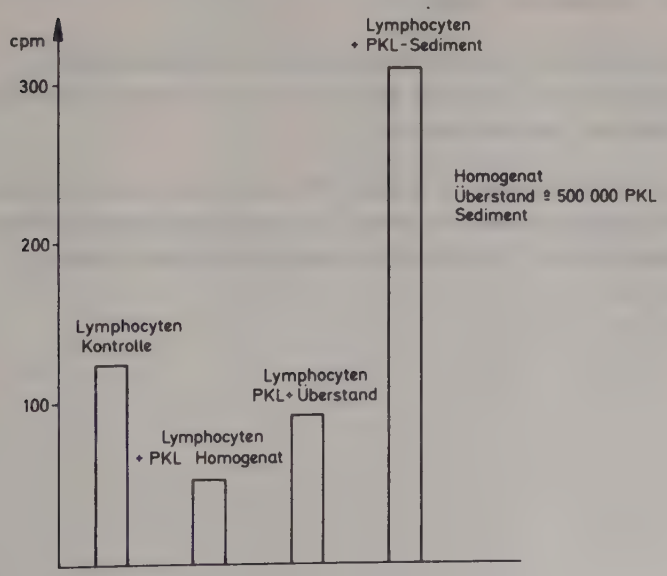
c) Einfluß von weiter aufgetrennten Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten

Es konnten nur wenige Versuche mit weiter aufgetrennten Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten durchgeführt werden, so daß eine significante Aussage hier nicht möglich ist.

Der hier dargestellte Versuch (Abb. 13 u. Tab. XII) Lymphocytenkulturen, denen durch Ultraschall gewonnene Homogenate polymorphkerniger Leukocyten zugesetzt wurden. Ferner sind Kulturen dargestellt, denen die Überstand- bzw. die Sedimentfraktion von Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten zugesetzt wurden, die zuvor in einer Kühl-Vakuum-Zentrifuge bei 130 000 x g über 1 h zentrifugiert wurden.

Abb. 13

Stimulation durch polymorphkernige Leukocyten-homogenate und nach Zentrifugation (1h × 130 000 × g) durch Überstand / Sediment



Bei dem dargestellten Versuch üben sowohl die Homogenate polymorphkerniger Leukocyten wie auch die Überstandfraktion einen inhibierenden Einfluß auf die Lymphocytenproliferation aus. Die Sedimentfraktion hingegen weist einen proliferationsfördernden Effekt auf.

Ergebnisse, die bei den Versuchen mit Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten gewonnen wurden:

Das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten ist weitgehend an intakte Membranen gebunden (siehe Abb. 11 u. Tab. X). Es liegen zwar Versuche vor, bei denen Homogenate polymorphkerniger Leukocyten einen proliferationsfördernden Effekt aufweisen (Abb. 11), jedoch ist dieser Effekt geringer als der Effekt intakter polymorphkerniger Leukocyten. Ferner liegen Versuche vor, bei denen Homogenate polymorphkerniger Leukocyten keinen Einfluß (Abb. 12) auf die Lymphocytenproliferation haben oder aber sogar eine inhibierende Wirkung zeigen (Abb. 13).

Das proliferationsfördernde Prinzip der polymorphkernigen Leukocyten wurde durch Inkubation bei 56°C zerstört, es ist nicht thermostabil (Abb. 12).

Eine weitere Auftrennung der Homogenate polymorphkerniger Leukocyten zeigt in einem Versuch eine proliferationsfördernde Wirkung der Sedimentfraktion.

Alle diese Versuche mit Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten haben exemplarischen Charakter, die Anzahl der durchgeführten Versuche reicht für eine statistisch signifikante Aussage nicht aus.

7. Wirkung von Enzymen und Enzyminhibitoren

a) Stimulation der mitogeninduzierten Lymphocytenproliferation durch Trypsin

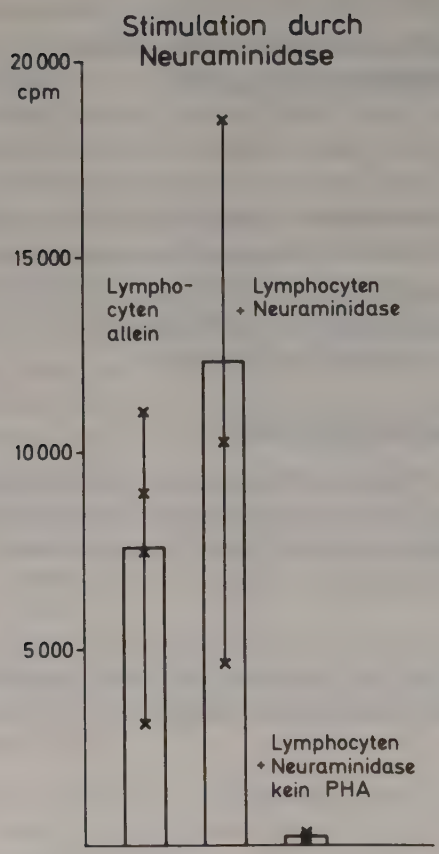
Wir setzten den Lymphocytenkulturen 0.5 - 100 µg Trypsin/ Kultur zu. Dabei zeigte sich, daß geringe Mengen Trypsin eine Proliferationssteigerung hervorriefen, hohe Konzentrationen allerdings eine Proliferationsinhibition bewirkten. Aus den durchgeführten Versuchen lassen sich aber noch keine signifikanten Ergebnisse ableiten, sie sind höchstens von qualitativer Bedeutung.

b) Stimulation durch Neuraminidase

Versuche, in denen wir PHA-stimulierten Lymphocytenkulturen Neuraminidase zusetzten, zeigen, daß auch hierdurch die Lymphocytenproliferation gesteigert werden konnte. (siehe Abb. 14 u. Tab. XIII)

Allerdings lassen sich auch aus diesen Versuchen noch keine statistische signifikanten Ergebnisse ableiten, die Zahl der durchgeführten Versuche ist zu gering.

Abb. 14



c) <u>Inhibition durch α-1-Antitrypsin</u>

In einem screening-Versuch konnte gezeigt werden, daß die Antiprotease α-1-Antitrypsin einen inhibitorischen Effekt auf das Proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten ausübt (siehe Abb. 15 u. Tab. XIV).

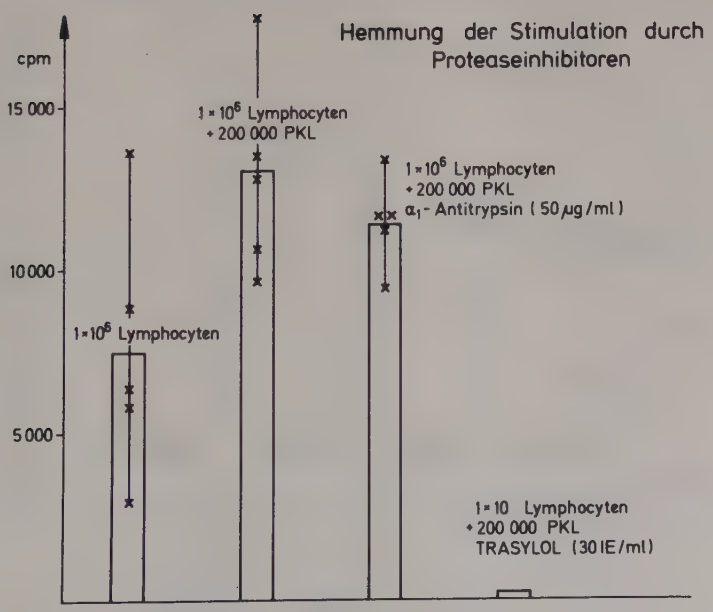
Eine Konzentrationsabhängige Inhibitionswirkung auf das Proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten ist in Abb. 17 (siehe auch Tab. XVI) dargestellt.

α-1-Antitrypsin als spezifische Antiprotease zeigt also einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten.

d) Inhibition durch Aprotinin

In einem screening-Versuch (Abb. 15 u. Tab. XIV) konnte gezeigt werden, daß das protease-hemmende Polypeptid Aprotinin einen inhibitorischen Effekt auf das Proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten ausübt.

Abb. 15

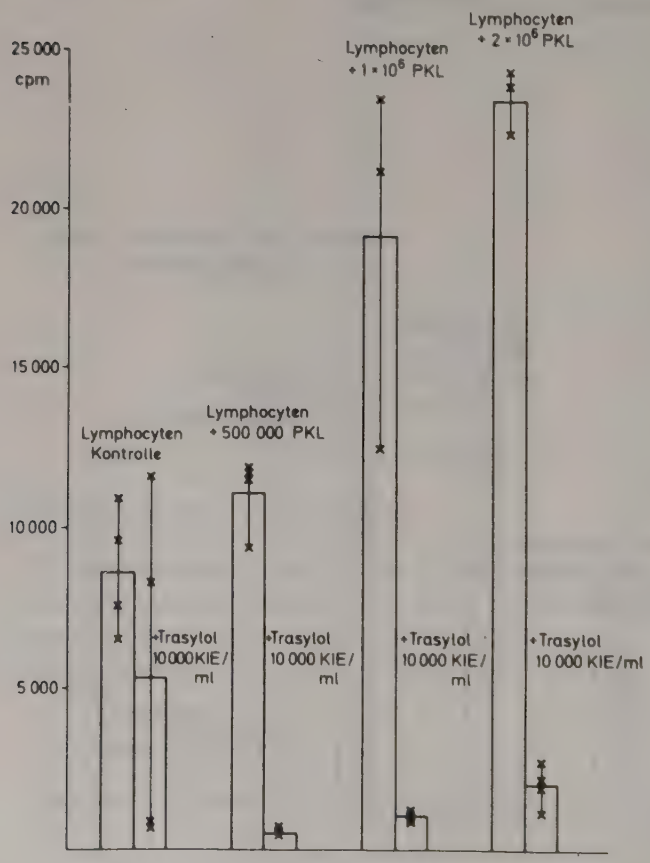


Eine Inhibitionswirkung bei steigenden Mengen polymorphkerniger Leukocyten ist in Abb. 16 (siehe auch Tab. XV) dargestellt.

Weitere Versuche zeigen, daß schon 10 - 30 KIU/ml ausreichen, um eine Inhibition der durch polymorphkernige Leukocyten gesteigerten Lymphocytenproliferation zu bewirken.

Aprotinin als proteaseinhibirendes Polypeptid zeigt also einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten.

Abb 16

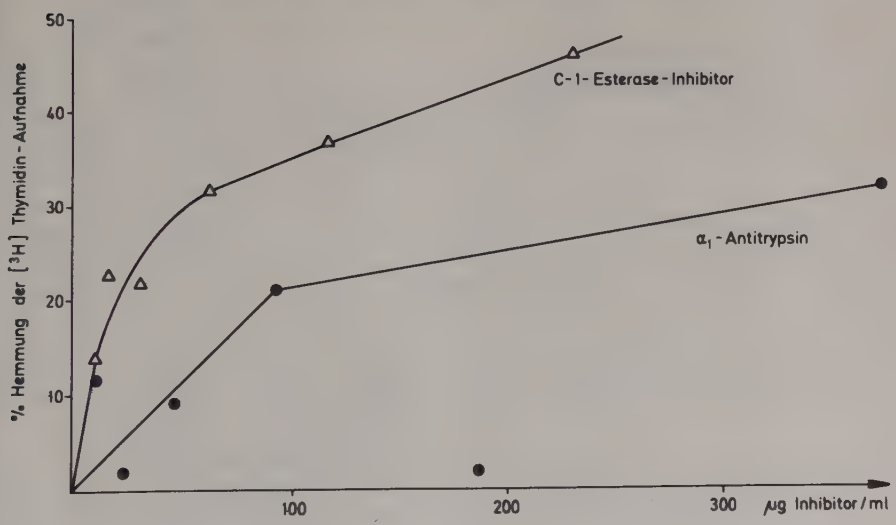


e) Inhibition durch den C-1-Esterase-Inhibitor (α-Neuramino-Glycoprotein)

Bei den Versuchen mit dem C-1-Esterase-Inhibitor zeigte sich die ausgeprägteste konzentrationsabhängige Inhibitionswirkung auf das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten (siehe Abb. 17 u. Tab. XVI). Dieser spezifische Inhibitor scheint die deutlichste Wirkung auf die durch polymorphkernige Leukocyten stimulierte Lymphocytenproliferation zu haben, doch auch hier können noch keine significanten Aussagen gemacht werden, die Zahl der durchgeführten Versuche ist zu gering.

Abb. 17

Einfluß von spezifischen Proteaseinhibitoren auf die durch polymorphkernige Leukocyten stimulierte Lymphocytenproliferation



Ergebnisse, die bei Versuchen mit Enzymen und Enzyminhibitoren gewonnen wurden

Diese Versuche zeigen, daß Proteasen (Trypsin) evtl. auch Neuraminidasen) den proliferationsfördernden Effekt polymorphkerniger Leukocyten auf die mitogeninduzierte Lymphocytenproliferation imitieren können.

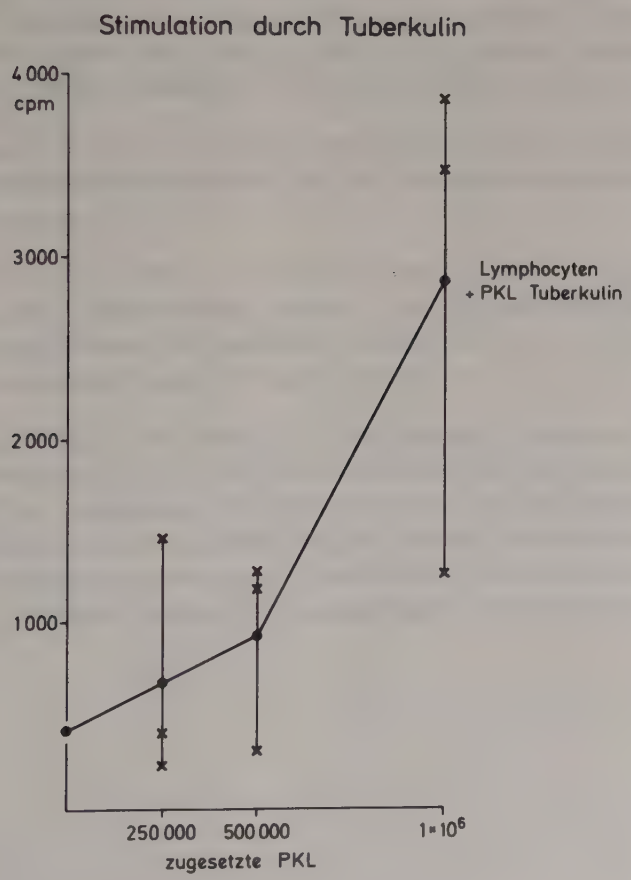
Proteaseinhibitoren hingegen wie Aprotinin und α-1-Antitrypsin haben einen inhibitorischen Effekt auf die durch polymorphkernige Leukocyten stimulierte Lymphocytenproliferation.

Den ausgeprägtesten inhibitorischen Effekt auf die durch polymorphkernige Leukocyten stimulierte Lymphocytenproliferation weist der C-1-Esterase-Inhibitor auf.

8. Spezifische Lymphocytenproliferation durch Tuberkulin

Versuche, in denen Lymphocytenkulturen von Tuberkulin-positiven Personen durch 20 µg Alttuberkulin/Kultur stimuliert wurden und dann mit polymorphkernigen Leukocyten versetzt wurden zeigen, daß das proliferationsfördernde Prinzip der polymorphkernigen Leukocyten nicht auf das durch mitogene Lectine (PHA) induzierte Lymphocytenwachstum beschränkt ist, sondern eine generelle immunologische Bedeutung hat.

Abb. 18



Aus Abb. 18 (siehe auch Tab. XVII) geht hervor, daß auch die durch Tuberkulin induzierte spezifische Lymphocytenproliferation eindeutig durch polymorphkernige Leukocyten gesteigert werden kann.

Dieser Effekt ließ sich wiederholt reproduzieren, so daß postuliert werden kann, daß das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten nicht auf die durch mitogene Lectine induzierte Lymphocytenproliferation beschränkt ist, sondern ein allgemein Wachstum förderndes Prinzip darstellt.

IV. Diskussion

A. Diskussion der Methode

Bei der Untersuchung der Interaktion zwischen Lymphocyten und anderen Zellen des peripheren Blutes, insbesondere mit anderen Leukocyten ist es wichtig, die einzelnen Zellpopulationen zunächst isoliert darzustellen und dann in definierten Mengen zusammenzugeben.

Die Lymphocyten wurden durch Säulenpassage über Nylonwatte gewonnen und nur dann weiterverwendet, wenn die Lymphocytensuspensionen zu 96-99 % aus mononucleären Zellen bestanden. Ferner wurde angenommen, daß die polymorphkernigen Leukocyten und die phagocytierenden Monocyten als adherent cells bei der Passage über Nylonwatte überwiegend an der Watte hängen bleiben würden.

Bereits 1964 zeigte Rabinowitz, daß polymorphkernige Leukocyten und phagocytierende Monocyten bei der Säulenpassage als adherent cells hängen blieben.

Wenn auch die Lymphocytensuspensionen nach der Nylonpassage fast nur Lymphocyten enthielten (96-99 %), so ist doch zu berücksichtigen, daß bereits geringe Mengen von adherent cells die Reaktion von Lymphocytenkulturen verändern können.

So fanden Levis und Robbins 1970, daß bereits 1 % adherent cells die PHA-stimulierte Lymphocytenproliferation deutlich beeinflussen. Jones 1966 zeigte den Einfluß polymorphkerniger Leukocyten bei PHA-stimulierten mixed Lymphocyte cultures auf. Er wies nach, daß bereits geringe Mengen polymorphkerniger Leukocyten in der mixed lymphocyte culture die Lymphocytenproliferation fördern.

Aus den angeführten Untersuchungen und auch den eigenen Versuchen wird deutlich, daß selbst "reine" Lymphocytensuspensionen, wie wir sie für unsere Lymphocytenkulturen verwendeten, bereits durch geringe Mengen phagocytärer Zellen -polymorphkerniger Leukocyten und Monocyten - "verunreinigt" sind, und daß diese phagocytären Zellen bei der Stimulation der Lymphocytenkulturen durch PHA eine Rolle spielen.

Neben der "Reinheit" der Lymphocytensuspensionen mußten wir bei unseren Versuchen berücksichtigen, daß man im peripheren Blut zumindest zwei Lymphocytenpopulationen findet. Es handelt sich um thymusabhängige oder T-Lymphocyten oder "Bone-marrow-derived" oder B-Lymphocyten.

Die Rolle der T-Lymphocyten in der Zellvermittelten Immunität und die Cytotoxicitätsprozessen darf heute als gesichert gelten. Goldstein 1971 beschreibt, daß nach Entfernungen aller B-Lymphocyten die T-Lymphocyten immer noch einen cytotoxischen Effekt ausüben können. T-Lymphocyten stellen sich als Rezeptorzellen dar, die allein zu immunologischer Cytotoxicität kompententa Zellen sind.

B-Lymphocyten hingegen sind für die Antikörperproduktion verantwortlich. Claman 1966 beschreibt, daß B-Lymphocyten nach Entfernung aller T-Lymphocyten immer noch zur Antikörperproduktion fähig waren.

Für unsere Versuche ist die Frage der Stimulierbarkeit von B- und T-Lymphocyten durch PHA von Bedeutung. Winkelstein 1970 zeigte, daß B- und T-Lymphocyten gemeinsam die ausgeprägteste Reaktion auf PHA zeigten.

Gery et al. 1972 stellte fest, daß PHA nur auf T-Lymphocyten einen stimuliertenden Effekt ausübt, und innerhalb der T-Lymphocyten wiederum besonders auf gewisse Untergruppen.

Bei unseren Untersuchungen gingen wir davon aus, daß durch PHA im wesentlichen T-Lymphocyten in den Lymphocytenkulturen stimuliert wurden. Dabei stellten wir in Rechnung, daß bei verschiedenen Versuchspersonen, denen wir Blut zur Lymphocytengewinnung entnahmen, das Verhältnis von T- und B-Lymphocyten im peripheren Blut variierte je nach der immunologischen Ausgangssituation der Spender. Für die Lymphocytenkulturen inkubierten wir jedoch konstant $1,5 \times 10^6$ Lymphocyten/Kultur. Bei verschiedenen Spendern enthielten diese 1.5×10^6 Lymphocyten/Kultur aus oben genannten Gründen unterschiedliche Anteile an T- und B-Lymphocyten, d. h. unterschiedliche Mengen stimulierbarer und nicht stimulierbarer Lymphocyten.

Die Gewinnung von "reinen" Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten bereitet theoretisch weniger Schwierigkeiten. Die durch Säulenelution gewonnenen polymorphkernigen Leukocyten wurden nur dann weiterverwendet, wenn sie zu 96-99 % polymorphkernige Leukocyten enthielten.

Unter den restlichen, mononucleären Zellen, konnten die darin vorhandenen Lymphocyten die Ergebnisse unserer Versuche nicht verfälschen, da diese Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten Lymphocytenkulturen zugesetzt wurden und wir nachweisen konnten, daß selbst der Zusatz von größeren Mengen Lymphocyten die Proliferation von Lymphocyten weitaus weniger beeinflußte als kleine Mengen polymorphkerniger Leukocyten. So dürften die wenigen Lymphocyten in den Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten keine erhebliche Rolle spielen.

Unter den in den Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten vorhandenen 1-4 % mononucleären Zellen ist ferner der Einfluß der phagocytierenden Monocyten zu diskutieren.

Die Ergebnisse von Jones 1966 zeigen bereits die Frage des Einflusses von monocytären Zellen in der durch PHA stimulierten mixed lymphocyte culture auf. Jones stellte die Hypothese auf, daß polymorphkernige Leukocyten die Transformation einiger kleiner Lymphocyten zu Makrophagen (Monocyten) induzieren, und daß diese neu gebildeten Makrophagen wiederum weitere kleine Lymphocyten zu blastoider Reaktion stimulieren. Die in den Lymphocytenkulturen bereits von vornherein vorhandenen Makrophagen sah er nicht als verantwortliche Zellen der Stimulation an.

Andere Autoren, wie Levis und Robbins 1966 beobachteten, daß die "glass adherent cells" die blastoide Reaktion in Lymphocytenkulturen förderten, ohne eine nähere Spezifizierung zwischen polymorphkernigen Leukocyten und Makrophagen näher zu erörtern.

Hinweise auf eine mögliche Beteiligung monocytärer Zellen bei PHA-stimulierten Lymphocytenkulturen liefern auch die Arbeiten von Gery et al. 1972 und Gery and Waksman 1972. Die Autoren zeigten, daß mit PHA stimulierte periphere Leukocyten Faktoren bilden, die die Proliferation von Lymphocytenkulturen stimulieren. Die Überstände ("supernatants" SUP) der mit PHA und anderen Mitogenen stimulierten peripheren Leukocyten förderten die Lymphocytenproliferation. Periphere Leukocyten, die von "adherent cells" befreit sind, können kein proliferationsförderndes "supernatant" mehr produzieren.

Die Autoren folgern hieraus, daß die "adherent cells", insbesondere Makrophagen, durch PHA stimuliert ein proliferationsförderndes "supernatant" bilden können.

Weitere Hinweise auf die Wirkung von monocytären Makrophagen liefern die Arbeiten von Chevernik und Lo Buglio 1973 und von Pike and Robinson 1970.

Chevernik und Lo Buglio 1973 demonstrierten, daß periphere Makrophagen aus menschlichem Blut das Wachstum von Zellkolonien aus Blut und Mark in vitro fördern. Die Autoren fanden, daß die Makrophagen einen Faktor produzieren (CSF = colony stimulating factor), der das Wachstum von polymorphkernigen Zellen in vitro fördert.

Pike and Robinson 1970 zeigten, daß periphere Leukocyten das Wachstum von Zellkolonien aus dem Knochenmark in vitro fördern. Die gewachsenen Kolonien bestanden im wesentlichen aus polymorphkernigen Zellen. Einige vorhandene Makrophagen wurden als Vorstufen polymorphkerniger Leukocyten angesehen.

Bei unseren Versuchen mußten wir annehmen, daß auch Monocyten als monocytäre "glass adherent" Makrophagen möglicherweise einen Einfluß auf die PHA-induzierte Lymphocytenproliferation ausüben.

Andererseits stellte Rabinowitz bereits 1962 fest, daß bei der Eluation von der Säule zuerst die polymorphkernigen Leukocyten im Eluat erschienen, dann erst monocytäre Zellen (Monocyten). Da wir nur eine kurze Säuleneluation vornahmen, erhielten wir weitgehend Suspensionen, die nur polymorphkernige Leukocyten enthielten. Aus diesem Grund glauben wir berechtigt zu sein, die beobachteten Effekte ausschließlich den Faktoren polymorphkerniger Leukocyten zuzuschreiben, die Zahl der möglicherweise zugesetzten Monocyten erscheint zu gering.

Ein Beispiel mag dies verdeutlichen:

Der Zusatz von 10 % polymorphkerniger Leukocyten (= 150 000 PKL / Kultur) bedeutet maximal den Zusatz von 0.2 % Monocyten, wenn man von einer Verunreinigung der Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten durch 2 % monocytäre Zellen ausgeht - sogar unter der Voraussetzung alle diese monocytären Zellen seien Monocyten.

Aus diesem Grund haben wir die beobachteten Effekte der Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten auf die mitogeninduzierte Lymphocytenproliferation allein auf den Einfluß polymorphkerniger Leukocyten bezogen, Einflüsse anderer "adherent cells" (Makrophagen, Thrombocyten) halten wir für möglich, aber nicht für unsere Versuche relevant. Thrombocyten wurden bei unseren Versuchen bereits durch den Aufarbeitungsprozess zerstört.

8. Diskussion der Ergebnisse

Bei Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, daß polymorphkernige Leukocyten, die methodischen Einschränkungen vorausgesetzt, einen nahezu durchweg signifikanten Einfluß auf die mitogeninduzierte Lymphocytenproliferation ausüben. Folgende Faktoren sollen bei diesen Ergebnissen im einzelnen diskutiert werden: Zunächst werden die Versuche betrachtet, die zeigen, daß für den proliferationsfördernden Effekt polymorphkerniger Leukocyten allein die Zellqualität entscheidend ist. Weiter werden die Ergebnisse, die den Einfluß der Zelldichte bei der mitogeninduzierten Lymphocytenproliferation darstellen, beleuchtet. Ferner soll die Bedeutung der unterschiedlichen Vorbehandlung polymorphkerniger Leukocyten erörtert werden. Zuletzt sind Probleme der statistischen Auswertung der Versuche berücksichtigt.

Die Ergebnisse der unter 1. und 2. dargestellten Versuche zeigen, daß die Zellqualität der polymorphkernigen Leukocyten von entscheidender Bedeutung für die Proliferationssteigerungen mitogeninduzierter Lymphocytenkulturen ist. Dies zeigen die Versuche, die Vergleiche darstellen zwischen Lymphocytenkulturen, denen polymorphkernige Leukocyten zugesetzt wurden und Kulturen, denen keine polymorphkernigen Leukocyten zugesetzt wurden oder denen weitere Lymphocyten zugesetzt wurden. Dies konnte dadurch erhärtet werden, daß polymorphkernigen Leukocyten allein keine nennenswerte H^3 Thymidineinbaurate nach Stimulation mit PHA aufwiesen. Es ist zwar bereits bekannt, daß polymorphkernige Leukocyten allein keine größere DNS-Synthese entwickeln, durch diese Versuche wurde es bestätigt, gleichzeitig konnten diese Vergleichskulturen dazu beitragen, zu zeigen, daß die back-ground H^3 Thymidininkorporation niedrig lag, oder daß zum anderen die Restaktivität mononucleärer Zellen, die in den Suspensionen polymorphkerniger Leukocyten noch vorhanden waren, sich als geringfügig herausstellte.

Die Proliferationssteigerung von Lymphocytenkulturen durch Zusatz polymorphkerniger Leukocyten läßt sich also, wie wir in unseren Versuchen zeigen konnten, nicht auf den Zusatz weiterer proliferationsfähiger Zellen zurückführen, sondern stellt eine Wirkung polymorphkerniger Leukocyten auf die Lymphocytenproliferation dar. Die Versuche, in denen die Wirkung von zugesetzten polymorphkernigen Leukocyten mit der Wirkung von zugesetzten Lymphocyten verglichen wurde, bestärken die Hypothese, daß die Zellqualität der polymorphkernigen Leukocyten hierbei von entscheidender Bedeutung ist.

Auch die Dichtestudien zeigen, daß das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten einen selbständigen Faktor darstellt. Die Zelldichte, insbesondere der Lymphocyten in der Kultur zeigt zwar einen deutlichen Einfluß auf die Lymphocytenproliferation, das proliferationsfördernde Prinzip der polymorphkernigen Leukocyten stellt jedoch einen hiervon unabhängigen Effekt dar.

Bei unseren Versuchen konnten wir davon ausgehen, daß bei 1.5×10^6 Lymphocyten / Kultur selbst bei maximaler Steigerung der Proliferation durch polymorphkernige Leukocyten der Sättigungsbereich nicht erreicht wurde. Erst wesentlich höhere Konzentrationen an Lymphocyten / Kultur dürften zu einer Wachtumsbegrenzung führen.

Allerdings zeigte sich bei einigen Versuchen bei denen bereits die Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten, eine hohe H-3-Thymidineinbaurate aufwiesen, daß die Proliferation durch polymorphkernige Leukocyten nicht mehr in sehr großem Ausmaß gesteigert werden konnte.

Aus diesen Ergebnissen liegt der Schluß nahe, daß proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten zwar einen von der Zelldichte unabhängigen Faktor darstellt, daß jedoch die Zelldichte bei der Proliferation von Lymphocytenkulturen eine Rolle spielt.

Es steht zu vermuten, daß die 1.5 x 10^6 Lymphocyten/Kultur keine völlig konstante Zelldichte darstellen, da die Zellzahlzählungen nicht automatisiert vorgenommen wurden und so immer eine gewisse Ungenauigkeit enthalten mußten. Es ist zu überlegen, ob die unterschiedlichen H^3 Thymidineinbauraten der Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten innerhalb eines Versuchs auf diese Ungenauigkeiten der Zelldichte der Lymphocyten/Kultur zurückzuführen sind. Die Unterschiede bei den verschiedenen Versuchen sind dagegen vermutlich eher auf die unterschiedliche immunologische Ausgangslage der Spender zurückzuführen.

Einen Einfluß auf das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten zeigte auch die Ammoniumchloridbehandlung (siehe die unter 4. dargestellten Versuche). Der proliferationsfördernde Effekt polymorphkerniger Leukocyten bleibt unter einer solchen Behandlung erhalten, eine Einschränkung des proliferationsfördernden Prinzips konnte jedoch festgestellt werden.

Bei der Auswertung aller Versuche wurden die Versuche mit und ohne Ammoniumchloridbehandlung gemeinsam ausgewertet, da es bei der vorliegenden Untersuchung, die qualitative Wirkung der polymorphkernigen Leukocyten zu erfassen.

Diese qualitative Wirkung der mit Ammoniumchlorid behandelten polymorphkernigen Leukocyten erwies sich jedoch als die gleiche wie die unbehandelter polymorphkerniger Leukocyten.

Die Inhomogenität der Versuchsergebnisse, insbesondere der Absolutergebnisse, soll unter zwei Gesichtspunkten diskutiert werden: Die Inhomogenität der H^3 Thymidineinbauraten der Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten und die Inhomogenität der Stimulationsrate durch polymorphkernige Leukocyten.

Bei der Inhomogenität der Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten, ist zu berücksichtigen, daß innerhalb eines Versuchsansatzes alle Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten zumindest vergleichbare Einbauraten aufwiesen. Die aufgetretenen geringen Unterschiede dürften auf Manipulationsfehler und Ungenauigkeiten der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein.

Die Unterschiede zwischen Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten, bei verschiedenen Versuchsansätzen erwiesen sich jedoch als relativ groß.

Den wesentlichen Faktor für diese Inhomogenität stellt vermutlich die Inkonstanz der Spender dar. Die unterschiedliche immunologische Situation der Spender konnte nicht ermittelt werden, ferner konnten wir auch nicht mit einer Konstanz des Verhältnisses T- zu B-Lymphocyten rechnen. Andererseits ist bekannt, daß nur T-Lymphocyten durch Mitogene zur Proliferation stimuliert werden können (Gery et al. 1972).

So könnte die Unterschiedlichkeit der Versuchspersonen den Hauptfaktor für die Inhomogenität darstellen. Hinweise hierfür ergeben sich bei den Versuchen, bei denen zweimal derselbe Spender das Blut für die Versuche spendete (dies wurde nur sehr selten durchgeführt). Hier zeigte sich, daß ein und derselbe Spender auch eine ähnliche Stimulierbarkeit durch PHA aufwies.

Nicht auszuschließen ist außerdem, daß geringe Verunreinigungen der Lymphocytensuspensionen durch polymorphkernige Leukocyten zu einer erhöhten H^3Thymidineinbaurate bereits bei den Kulturen die nur Lymphocyten enthielten, führte.

Die Unterschiede in der Stimulierbarkeit von mitogeninduzierten Lymphocytenkulturen durch polymorphkernige Leukocyten dürfte zunächst auf die naturgemäß technisch noch nicht befriedigende Technik der Zellisolierung zurückzuführen sein. Ferner dürfte wieder die augenblickliche immulologische Reaktionszustand des Spenders einen wesentlichen Faktor für die unterschiedliche Stimulationsrate durch polymorphkernige Leukocyten darstellen. Auch ist zu berücksichtigen, daß bei den Versuchen, bei denen bereits die Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten, eine hohe H^3 Thymidineinbaurate aufwiesen aus den oben genannten Gründen keine so ausgeprägte Proliferationssteigerung durch polymorphkernige Leukocyten aufwiesen.

Zuletzt muß darauf hingewiesen werden, daß polymorphkernige Leukocyten und Lymphocyten des jeweiligen Spenders bereits in vivo miteinander in Berührung kommen und so schon Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellen den Versuchsbedingungen in vitro vorausgehen.

Neben diesen Problemen mußten bei der statistischen Auswertung noch folgende Punkte berücksichtigt werden:

Zu den verschiedenen Versuchsansätzen konnte jeweils nur eine raltiv geringe Zahl an Versuchen durchgeführt werden. Die Zahl der Kulturen pro Versuch war von der Anzahl der gewonnenen Zellen abhängig und somit eingeschränkt. Hierdurch wurde der Stichprobenumfang unserer Versuche eingeschränkt.

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen somit noch keine Normalverteilungstendenzen und wiesen eine große Streuung auf.

H ieraus ergab sich die Konsequenz, die statistische Auswertung nach dem U-Test von Mann und Whitney 1947 (Rangtrst) vorzunehmen.

Auf ihm beruhen auch die in Tab. VI angegebenen Signifikanzgrenzen. Diese Signifikanzgrenzen beziehen sich auf die Absolut-Ergebnisse der einzelnen Kulturen innerhalb eines Versuches.

Für die Darstellung der Auswertung hingegen wählten wir wegen der Inhomogenität der Ergebnisse der verschiedenen Versuche bei der Gesamtauswertung eine relative Darstellung der Stimulationsraten bezogen auf den Mittelwert der Kulturen, die nur Lymphocyten enthielten (= 100 %).

Eine genauere quantitative Aussage über die Lymphocytenkulturen durch polymorphkernige Leukocyten würde eine weit größere Zahl von Versuchen unter konstanten Versuchsbedingungen und einen größeren Stichprobenumfang voraussetzen. Unsere Versuche konnten dazu dienen, die qualitative Wirkung polymorphkerniger Leukocyten auf Lymphocytenkulturen statistisch abzusichern. Hier muß darauf hingewiesen werden, daß die Versuche, die anschließend durchgeführt wurden, um den Mechanismus der Wirkung polymorphkerniger Leukocyten interpretieren zu können, (Versuche der Interaktion mit Serum, Versuche mit zerschallten polymorphkernigen Leukocyten sowie die Enzymversuche) wegen der geringen Anzahl der Versuche, die jeweils durchgeführt wurden, nur Ansätze liefern können, wie wir uns den Mechanismus der Proliferationssteigerung vorstellen. Wir konnten keine statistisch abgesicherten Aussagen machen, die würde die Durchführung weiterer Versuche voraussetzen.

Die Wirkung von Phythämagglutinin (PHA) als Mitogen zur Proliferation von Lymphocytenkulturen ist noch nicht näher aufgeklärt. Untersuchungen weisen darauf hin, daß sich PHa an die Oberflächenstruktur der Zellmembran anlagert. Die Folge ist eine Aktivierung des Membranstoffwechsels. Resch et al. 1971 zeigten, daß PHA eine Änderung des Phospholipid-Metabolismus hervorruft. Änderungen der Phospholipidstrukturen können Veränderungen der Struktur und der Funktion von Lymphocytenmembranen hervorrufen. Da Proteine und Phospholipide die Biologischen Membranen durch apolare Interaktionen miteinander verknüpft sind, können Veränderungen der Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide die Membranfunktionen beeinflussen. Die hat einerseits Einfluß auf die Membranpermeabilität und den intracellulären Stoffwechsel und andererseits auf die Rezeptorkonfiguration der Zellmembran. Beide Faktoren spielen bei der mitogen induzierten Lymphocytenproliferation eine Rolle.

Die Untersuchungen von Havemann et al. 1970 weisen darauf hin, daß auch das umgebende Milieu für die Lymphocytenproliferation von entscheidender Bedeutung ist. Insbesondere die Anwesenheit bestimmter Wachstumsfördernder oder hemmender Serumfraktionen und die Abhängigkeit von den Serum-präcipitierenden Eigenschaften von PHA wurden untersucht. Der Angriffsort von PHA an der Zellmembran stellt ein Rezeptorglycoprotein dar. Da die Bindung durch Vorinkubation mit N-acetyl-galactosamin hemmbar ist, wird angenommen, daß die Bindung an Oligosaccharid-Strukturen des Glycoprotein erfolgt. Die Autoren diskutieren zwei PHA-Komponenten, die an unter schiedlichen Rezeptoren angreifen. Während die eine Fraktion mit dem Glycoprotein der Zellmembran reagiert, reagiert die andere mit Serum-Makroglobulinen an der Zellmembran.

Bei unseren Versuchen konnten wir sehen, daß der Zusatz des autologen Serums zu Lymphocytenkulturen einen deutlichen Einfluß auf die Proliferation durch PHA aufwies. Mit 0.2 ml Serumzusatz/Kultur (= 10 %) lagen wir im Bereich der optimalen Wirkung eines Serumzusatzes. Wir konnten mit unseren Versuchen die Mittlerfunktion von Serum bei der PHA-induzierten Lymphocytenproliferation bestätigen, über die Wirkung polymorphkerniger Leukocyten in diesem System gaben jedoch erst die Versuche weitere Ergebnisse, bei denen eine Vorinkubation von polymorphkernigen Leukocyten mit verschiedenen Medien vorgenommen wurde. Als entscheidend für das proliferationsfördernde Prinzip erwies sich hierbei die Interaktion der polymorphkernigen Leukocyten mit autologen Serum. Nur die Überstände von Vorinkubationssuspensionen, die zumindest Serum und polymorphkernige Leukocyten enthielten (mit oder ohne TC 199 oder PHA bei der Vorinkubation) zeigten eine ähnliche proliferationsfördernde Wirkung auf die mitogeninduzierte Lymphocytenproliferation wie die intakten polymorphkernigen Leukocyten.

Neben einer direkten Wirkung polymorphkerniger Leukocyten auf die Lymphocytenproliferation muß somit eine serumvermittelte Wirkung der polymorphkernigen Leukocyten diskutiert werden. So kommt eine Freisetzung von Wachstumsfördernden aus Serumfraktionen in Frage, die sich möglicherweise durch eine enzymatische Wirkung der polymorphkernigen Leukocyten erklären läßt. Zu diskutieren ist aber auch eine Mittlerfunktion von Serum bei der Interaktion der polymorphkernigen Leukocyten mit der Lymphocytenmembran und PHA. Auch hier erscheint es möglich, daß polymorphkernige Leukocyten eine enzymatische Wirkung aufweisen, die die Reaktionen zwischen PHA und der Lymphocytenmembran fördert und dadurch eine Proliferationssteigerung hervorruft. Wir vermuteten bei unseren Versuchen, daß polymorphkernige Leukocyten, ähnlich wie bei den beobachteten Membranveränderungen an der Erythrocytenoberfläche (Arend u. Malchow 1972) Rezeptorveränderungen hervorrufen können. Weiterführende Untersuchungen zur Wirkung von homogenisierten polymorphkernigen Leukocyten und zur Wirkung von Enzymen und Enzyminhibitoren sollten Hinweise auf einen möglichen Mechanismus der Wirkung polymorphkerniger Leukocyten geben.

Die Versuche mit Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Es ließ sich nicht nachweisen, daß Homogenate polymorphkerniger Leukocyten eindeutig einen proliferationsfördernden Effekt ausüben. Dies steht im Gegensatz zu der Wirkung polymorphkerniger Leukocyten auf Rezeptoreigenschaften von Erythtrocyten, die sich auch mit Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten darstellen ließ (Arend et al. 1972 a).

Ein weiterer Unterschied zeigt sich darin, daß die Rezeptormodifizierende Eigenschaft polymorphkerniger Leukocyten thermostabil , das proliferationsfördernde Prinzip hingegen labil ist.

Die widersprüchlichen Ergebnisse mit Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten weisen möglicherweise darauf hin, daß das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten primär oder sekundär an intakte Oberflächenstrukturen gebunden sein muß, bei deren Zerstörung die wachstumsfördernden enzymatischen Eigenschaften mitzerstört werden.

Es ist aber auch zu diskutieren, daß bei der Homogenisierung polymorphkerniger Leukocyten aus dem Leukocytoplasma Proteaseinhibitoren freigesetzt werden, die sofort mit den dann ebenfalls freiwerdenden Proteasen interagieren.

Einen weiteren Hinweis zu der Diskussion der unterschiedlichen, gelegentlich auch inhibitorischen Wirkung von Leukocytenhomogenaten liefert die Arbeit von Bleyl und Nagel 1968, die Autoren zeigten in ihren Experimenten, daß Leukocytenhomogenate und die Überstände dieser Homogenate einen inhibitorischen Effekt aufwiesen, die Sedimentfraktion jedoch eine Leukocytenprotease enthielt.

In dem von uns dargestellten Versuch, bei dem Homogenate polymorphkerniger Leukocyten Kühl-Vakuum-zentrifugiert wurden (130 000 x g) und sowohl die Homogenate als auch die Überstände und die Sedimentfraktion Lymphocytenkulturen zugesetzt wurden, zeigten Homogenat und Überstand einen inhibierenden Effekt, die Sedimentfraktion jedoch einen Stimulationsfördernden Effekt. Allerdings wurden hierzu zu wenig Versuche durchgeführt, der dargestellte Versuch kann somit nur kurz diskutiert werden.

Unsere Ergebnisse und die Arbeiten von Bleyl und Nagel 1968 lassen die mögliche Folgerung zu, daß das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten weitgehend an intakte Membranfunktionen gebunden ist und daß bei der Homogenisierung durch Ultraschall möglicherweise der proteaseinhibierende Faktor proliferationsinhibierend wirkt.

Die in der Sedimentfraktion dargestellte Leukocytenprotease hingegen kann einen proliferationsfördernden Effekt aufweisen.

Aufgrund der Voruntersuchungen (Erythrocytenversuche Arend u. Malchow 1972) und der Ergebnisse der eigenen Versuche mit Serumvorinkubation und der Versuche mit Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten wurde bei der Diskussion um den Wirkungsmechanismus der Proliferationssteigerung in erster Linie an Enzyme gedacht, die in polymorphkernigen Leukocyten enthalten sind. Es soll diskutiert werden, welche Enzyme diese Proliferationssteigerungen hervorrufen könnten und auf welche Weise diese Enzyme wirken. Ferner soll die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß sie vermittelt über Serumfaktoren oder direkt spezifische Membranveränderungen hervorrufen, die die Mitogenstimulation von Lymphocytenkulturen fördern.

Es liegen eine Reihe von Untersuchungen über die in polymorphkernigen Leukocyten vorkommenden Enzyme vor. Janoff u. Zeligs 1968 wiesen in den Granula eine Kathepsin- oder Trypsinähnliche neutrale Protease mit etwas anderer Spezifität nach. Ähnliche Proteasen fanden Davies et al. 1970 in Kaninchen-Granulocyten und Folds et al. 1972 zeigten, daß in menschlichen polymorphkernigen Leukocyten eine membrangebundene neutrale Protease vorhanden ist. Neben der neutralen Protease konnten in polymorphkernigen Leukocyten noch weitere Enzyme nachgewiesen wrden. Dargestellt wurden Aminopeptidasen (Folds et al. 1972, Davies et al. 1970), aromatische Esterasen (Davies et al. 1970, Ward u. Becker 1968 u. 1970, Becker 1972) acetatophile Esterasen (Becker u. Eard 1969).

Dies Esterasesystem spielt bei der Chemotaxis eine entscheidende Rolle (Ward u. Becker 1967 und alle folgenden Veröffentlichungen). Ferner ist bekannt, daß Membrangebundene Enzyme polymorphkerniger Leukocyten auch bei Arthus- und Schwartzmann-Phänomenen eine Rolle spielen Janoff u. Zeligs 1968, Thomas 1964).

Die Untersuchungen von Folds et al. 1972 zeigen, daß diese Enzyme in polymorphkernigen Leukocyten membrangebunden sind und sich bei der Sedimentauftrennung in Granula verschiedener Dichtebanden darstellen lassen.

Die Granula polymorphkerniger Leukocyten entleeren sich bei Kontakt mit Immunkomplexen in aus Membrananteilen gebildete Vakuolen (Cohn und Fedorko 1969) und bilden phagocytierenden Lysosomen. So können Enzyme freigesetzt und Phagocytoseprozesse in Gang gesetzt werden. Bekannt ist diese Reaktion polymorphkerniger Leukocyten beim Schwartzmann-Phänomen (Thomas 1964), wo bei Kontakt mit dem Immunkomplex aus den Granula die Enzyme freigesetzt werden.

Auch an Zellmembranen können diese Enzyme polymorphkerniger Leukocyten Veränderungen hervorrufen. Arend u. Malchow 1972 beschreiben Rezeptorveränderungen an Erythrocyten durch Inkubation mit polymorphkernigen Leukocyten. Die Autoren postulieren, daß diese Veränderungen, die auf Veränderungen in der Glycolipidstruktur in der Zellmembran hinweisen, durch Proteasen und Glucosidasen hervorzurufen waren und auch durch proteaseinhibitoren oder verschiedene Zucker unterdrückt werden konnten. Auch andere Autoren haben beschrieben, welche Enzyme Veränderungen an der Zellmembran hervorrufen. Hynes 1972 beschrieb Veränderungen der Zell-Oberflächen-Proteine, die durch Proteasen hervorgerufen werden konnten. Burger 1970 beschrieb eine Wachstumszunahme von Fibroblasten durch Behandlung mit Proteasen (Trypsin) Hohe Konzentrationen an Trypsin allerdings stoppen jegliches Wachstum (Cook et al. 1962). Ähnliches beobachteten auch wir: setzten wir PHA-stimulierten Lymphocytenkulturen geringe Mengen Trypsin zu, zeigte sich eine Proliferationssteigerung, hohe Konzentrationen allerdings bewirkten eine Proliferationsinhibition.

Burger 1971 wies nach, daß Proteasen an Zellen ähnliche Veränderungen hervorrufen, wie sie bei Tumorzellen auftreten. Er zeigte, daß die fehlende Wachstumsinhibition wesentlich auf Membranrezeptorveränderungen zurückgeht. Diese Membranrezeptorveränderungen korrellieren auch mit der Fähigkeit der Zellen, mit Agglutininen (z. B. PHA, Concavalin A) zu reagieren. Zunehmende Agglutinierbarkeit und fehlende Wachstumsinhibition sind Kennzeichen der Tumogenese. Diese Veränderungen können jedoch auch durch Proteasen evtl. auch durch Neuraminidasen hervorgerufen werden.

Burger 1971 entwickelte aus den obengenannten Forschungsergebnissen ein Modell über den Entstehungsmechanismus der Membranveränderungen an Tumorzellen gegenüber den Membranstrukturen intakter Zellen. Er zeigte, daß die Membranveränderungen den Membranveränderungen ähnlich sind, die durch Proteolytische Behandlung intakter Zellen hervorgerufen werden können. Die "neu" auftretenden Rezeptoren für z. B. Lectine entsprechen keiner de novo Synthese, sondern entstehen durch Freilegung von Glycoproteidstrukturen, die zuvor durch Proteine oder andere Glycoproteine überlagert waren. Diese Freisetzung von "neuen" Rezeptoren wird vermutlich durch in der Tumorzelle auftretenden Proteasen und Neuraminidasen hervorgerufen. Durch enzymatische Abspaltung werden "neue" Strukturen freigelegt. Die Veränderungen an der Zellmembran bei Tumor und Trypsin behandelten Zellen korrellieren mit der Fähigkeit mit Agglutininen (PHA, Concavalin A) zu reagieren. Die Zunahme der Korrellierbarkeit korrelliert mit dem Verlust der Wachstumsinhibition.

Singer und Nicolson 1972 entwickelten ein völlig neues Modell über den Entstehungsmechanismus von Membranveränderungen. Sie postulieren Zellmembranen als "fluid-membranes" bestehend aus einer Matrix von Glycolipiden, mit darin frei verteilt eingebetteten Proteinen. Dieses Modell wird den derzeit bekannten Phänomenen an der Zellmembran am besten gerecht. Die Autoren

führen Zellembranveränderungen, wie sie bei Tumorgenese oder durch Proteasewirkung auftreten, darauf zurück, daß die Enzyme die mehr polaren, an der Oberfläche der Membranen liegenden Glycoproteine und andere polare Proteide abspalten, daß die Restproteide mehr hydrophoben Charakter aufweisen und dementsprechend diese hydrophoben Gruppen aus thermodynamischen Gründen innerhalb der fluid-membrane diffundieren und aggregieren. Durch diese Diffusion in der fluid-membrane entstehen cluster solcher hydrophoben, agglutininbindenden Rezeptoren. Hieraus erklärt sich die erhöhte Agglutinierbarkeit und die vermehrte Bindung von Lectinen (Concavalin A, PHA).

Burger und Noonan 1970 konnten zeigen, daß die fehlende Wachstumsinhibition nach proteolytischer Behandlung durch Besetzung der Agglutininrezeptoren mit entsprechenden gespaltenen Lectinen mit nur einer Bindungsstelle wiederhergestellt wurde. Hozumi et al. 1972 gelang es, die Transformation intakter Zellen durch DMBA zu Tumorzellen mit Hilfe von Proteaseinhibitoren zu unterdrücken. Dies bedeutet eine Bestätigung der Hypothesen von Hynes 1973 und Burger 1970, daß Proteasen an der Tumorgenese, den Membranrezeptorveränderungen und dem Verlust der Wachstumsinhibition beteiligt sind.

Die Veränderungen an der Oberfläche der Zellmembran stellen somit eine Änderung der Rezeptorglycolipide dar. Hakomori et al. 1968 konnten dies an der Zelloberfläche von normalen und transformierten Zellen nachweisen. Neben Proteasen scheinen Esterasen bei diesen Phänomenen eine Rolle zu spielen. Uhlenbruck und Gielen 1970 vermuteten, daß Neuraminsäure als Bestandteil von Glycolipidstrukturen in der Zellmembran bei der malignen Transformation der Zellembran eine wesentliche Rolle spielen.

Bei den eigenen Versuchen über den Einfluß von Enzymen auf die Lymphocytenproliferation zeigte sich, daß Trypsin und Neuraminidase eine Steigerung der Lymphocytenproliferation hervorrufen konnten.

Die Phänomen würde dafür sprechen, daß auch an der Lymphocytenmembran durch diese Enzyme Veränderungen in der Glycolipidstruktur der Membranrezeptoren auftreten. Hierbei kommt es zu Veränderungen der Membrankonfiguration entweder durch Abspaltung von Proteiden und Freisetzung von darunter liegenden Rezeptoren (Burger 1971) oder durch Veränderungen der Membrankonfiguration so wie sie Singer und Nicolson 1972 für "Rezeptorhäufungen" in "fluid-membranes" beschreiben. Durch das vermehrte Auftreten von Glycolipigrezeptorstrukturen, kann auch eine erhöhte Bindung Agglutininen auftreten, so z. B. mit PHA. Es ist bekannt, daß PHA spezifisch mit N-acetylgalactosamingruppierungen reagiert (Burger 1971). Allerdings muß man hierbei berücksichtigen, daß das Leukoagglutinin des PHA nicht unbedingt identisch mit dem Mitogen ist.

Die Versuche, die mit Enzyminhibitoren durchgeführt wurden, sollten Hinweise dafür geben, ob die in polymorphkernigen Leukocyten vorhandenen Enzyme polymorphkernige Leukocyten in ähnlicher Weise auf die Membranstrukturen von Lymphocyten wirken wie oben geschildert. Wir gingen dabei von der Hypothese aus, daß, wenn die Enzyme polymorphkerniger Leukocyten derartig an der Lymphocytenproliferation beteiligt sind, auch eine Inhibition durch spezifische Enzyminhibitoren möglich ist.

Bei diesen Versuchen konnten wir nachweisen, daß Proteaseinhibitoren (z. B. Aprotinin) einen inhibitorischen Effekt auf die durch polymorphkernige Leukocyten stimulierte Lymphocytenproliferation aufweisen. Die spezifische Inhibition durch α-1-Antitrypsin weist darauf hin, daß die in polymorphkernigen Leukocyten vorhandene Protease an diesem Prozess beteiligt ist.

Möglicherweise wird durch diese Protease eine erhöhte Fixierung des Mitogens an freigelegten Rezeptorstrukturen hervorgerufen.

Neben den Proteaseinhibitoren konnten wir eine Inhibition durch Esteraseinhibitoren wie Neurarinsäure als Inhibitor von Neuraminidasen, insbesondere aber eine spezifische Inhibition durch den C$^{\bar{2}}$1-Esterase-Inhibitor (α-Neuraminoglycoprotein) darstellen.

Dies könnte darauf hindeuten, daß auch eine proliferationsfördernde Leukocytenesterase existiert, die vielleicht sogar mit dem Esterase-System identisch ist, welches bei der Chemotaxis (Becker und Ward) eine Rolle spielt. Die Esterase könnte einen direkten Effekt auf die Membranstruktur der Lymphocyten wie auch die Protease aufweisen, zu diskutieren ist allerdings auch eine Wirkung auf Serumfraktionen mit im Kininsystem kaskadenartig (ähnlich dem Gerinnungssystem Mac Farlane 1964, Davie 1964) ablaufenden Reaktionen, bei denen wachstumsfördernde Faktoren freigesetzt würden. Die Untersuchungen mit Leukocyten behandelten Seren machen einen solchen Mechanismus wahrscheinlich.

Eine Beteiligung plasminogenaktivierender Faktoren erscheint unwahrscheinlich, da ε-amino-caprosäure keinen Einfluß auf die Lymphocytenproliferation zeigte.

Die Versuche, bei denen Lymphocytenkulturen von Tuberkulinpositiven Spendern durch Tuberkulin zur Proliferation stimuliert wurden und diese Stimulation durch polymorphkernige Leukocyten gesteigert werden konnte, weisen darauf hin, daß das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten ein allgemeines wachstumsförderndes Prinzip darstellt und nicht auf die durch mitogene Lectine induzierte Lymphocytenproliferation beschränkt ist. Hierfür spricht auch, daß die durch polymorphkerniger Leukocyten gesteigerte Lymphocytenproliferation durch Aprotinin inhibierbar ist, wie wir in einigen Versuchen nachweisen konnten.

Experimente in vitro lassen immer nur einen vorsichtigen Rückschluß auf das Geschehen in vivo zu. Einige Tatsachen über die Wirkung polymorphkerniger Leukocyten dürfen aber als gesichert gelten. Thomas 1964 zeigte, daß polymorphkernige Leukocyten bei Kontakt mit Immunkomplexen Enzyme freisetzen und diskutierte ihre Rolle beim "Schwartzmann-Phänomen". Auf Grund dieser Beobachtungen darf angenommen werden, daß die Rolle der polymorphkernigen Leukocyten bei immunologischen Reaktionen in der Freisetzung von Phagocyten-Enzymen liegt. Die polymorphkernigen Leukocyten treten mit als erste in Aktion, ihre Wirkung geht der immunologischen voraus und mag für die Vermittlung der Reaktion von Lymphocytenantigenen und der verstärkten Demaskierung und anderweitiger Diskriminierung von Antigenrezeptoren von Bedeutung sein.

Die Ergebnisse der Arbeiten von mehreren Autoren zeigen, daß Zellen in vitro durch die Wirkung proteolytischer Enzyme der Wachstumskontrolle entgleiten. (Burger 1971, Hakomori et al 1968). Die Beobachtungen, daß in Geweben von Tumorkranken hohe Proteasekonzentrationen gefunden wurden, läßt auch eine Beteiligung von proteolytischen Enzymen an einigen Karzinogenesemechanismen möglich erscheinen.

Es dürfte also die Wirkung der Phagocyten-Enzyme nicht nur unter dem Aspekt einer Steigerung der Proliferation der Immunkompetenten Zellen bzw. einer Steigerung der Cytotoxicität gesehen werden, sondern auch als condition sine qua non für Wachstumsveränderungen von Zellen anderer Herkunft. (z. B. auch von Tumoren).

Zusammenfassung:

Ausgehend von Beobachtungen an der Erythrocytenmembran, die durch polymorphkernige Leukocyten hervorgerufen wurden, wurde der Fragestellung nachgegangen, ob polymorphkernige Leukocyten die Proliferation von Lymphocyten in der Kultur ebenfalls über Membranrezeptorveränderungen beeinflussen können. Andererseits sollte überprüft werden, ob polymorphkernige Leukocyten neben Veränderungen von Rezeptorstrukturen möglicherweise auch Veränderungen des Mediums von Lymphocytenkulturen hervorrufen können, die einen Einfluß auf die Proliferation von Lymphocytenkulturen bewirken.

Als Modell diente die durch PHA aus Phaseolus vulgaris induzierte Proliferation.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß polymorphkernige Leukocyten in Abhängigkeit von der Anzahl eine Proliferationssteigerung in PHA-induzierten Lymphocytenkulturen hervorrufen. Polymorphkernige Leukocyten in isolierten Kulturen zeigten keine nennenswerte Proliferation, gemessen an der H^3Thymidineinbaurate. Der Zusatz polymorphkerniger Leukocyten zu Lymphocytenkulturen zeigte jedoch eine significante Steigerung der Lymphocytenproliferation. Ein Zusatz entsprechender Mengen weiterer Lymphocyten zu den Lymphocytenkulturen bewirkte eine weitaus geringere Zunahme der H^3Thymidineinbaurate, die dem Zusatz von weiteren proliferationsfähigen Zellen entsprach. Die Zelldichte der Lymphocyten in den Kulturen hatte einen Einfluß auf die H^3Thymidineinbaurate, die Proliferationssteigerung durch polymorphkernige Leukocyten ließ sich aber als hiervon unabhängig darstellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß polymorphkernige Leukocyten in Abhängigkeit von ihrer Anzahl in der Kultur eine signifikante Proliferationssteigerung autologer Lymphocyten hervorrufen.

Der Mechanismus dieser Wirkung wurde anhand von einigen exemplarischen Versuchen weiter untersucht. Es zeigte sich, daß bei Vorinkubation polymorphkerniger Leukocyten mit autologem Serum auch ein proliferationsfördernder Effekt der entsprechenden Überstände zu beobachten ist. Eine Mittlerfunktion von möglicherweise neuentstandenen Serumkomponenten auf die Lymphocytenproliferation ist somit anzunehmen.

Versuche mit Homogenaten polymorphkerniger Leukocyten lassen vermuten, daß das proliferationsfördernde Prinzip membrangebunden ist, daß aber bei der Homogenisierung polymorphkerniger Leukocyten neben den membrangebundenen stimulierenden Faktoren weitere vermutlich auch inhibierende Faktoren freigesetzt werden.

Die Versuche mit Enzymen und Enzyminhibitoren weisen darauf hin, daß Granulocyten-Proteasen an diesem proliferationsfördernden Effekt polymorphkerniger Leukocyten ausschlaggebend beteiligt sein müssen. Es wurde hierbei einerseits eine direkte Wirkung der Enzyme polymorphkerniger Leukocyten auf die Lymphocytenmembran diskutiert. Hierbei ist an durch Enzyme hervorgerufene Rezeptorveränderungen und an eine vermehrte Freilegung von Mitogenrezeptoren zu denken. Andererseits wurde die Möglichkeit erwogen, daß diese Enzyme wachstumsfördernde Faktoren aus bestimmten Serumfraktionen freisetzten.

Versuche mit Tuberkulinstimulierten Lymphocytenkulturen zeigen, daß das proliferationsfördernde Prinzip polymorphkerniger Leukocyten nicht auf die durch mitogene Lectine induzierte Lymphocytenproliferation beschränkt ist, sondern eine allgemeine Bedeutung für immunologische Prozesse zu besitzen scheint.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) Arend, P., Malchow, H., Cappeller, D. und Becker, Ch.
Mittlerfunktionen polymorphkerniger Leukocyten bei der mitogeninduzierten Proliferation autologer Lymphocyten
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 78:681 (1972) a

2) Arend, P., Malchow, H. and Cappeller, D.
Possibility of enzymatic internaction between polymorphonuclear leukocytes and autologous lymphocytes in the mitogen-induced lymphocyte proliferation
Z. Immun.-Forsch. 144: 366 (1972) b

3) Arend, P. and Malchow, H.
Enzymatic actions of polymorphonuclear leukocytes on specific membrane receptors of autologous cells
Eur. J. Immunol. 2: 292 (1972)

4) Becker, E. L. and Ward, P. A.
Esterases of the polymorphonuclear leukocyte capable of hydrolyzing acetyl DL-phenylalanine ß-naphthyl ester
J. exp. Med. 129: 569 (1969)

5) Becker, E. L.
The relationship of the chemotactic behavior of the complement-derived factors, C3a, C5a, and C 567, and a bacterial chemotactic factor to their ability to activate the proesterase 1 of rabbit polymorphonuclear leukocytes
J. exp. Med. 135: 376 (1972)

6) Bleyl, U. und Nagel, W.
Untersuchungen zur leukocytären Fibrinolyse
Klin. Wschr. 46: 417 (1968)

7) Burger, M. M.
Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth
Nature 277: 170 (1970)

8) Burger, M. M.
Cell surfaces in neoplastic transformation
Curr.Top.Cell. Reg. 3: 135 (1971)

9) Burger, M. M. and Noonan, K. D.
Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumor cell surface
Nature 288: 512 (1970)

10) Chervenick, P. A. and LoBuglio, A. F.
Human blood monocytes: stimulators of granulocyte and mononuclear formation in vitro
Science 178: 164 (1972)

11) Claman, H. N., Chaperon, E. A. and Triplett, R. F.
Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production
Proc. Soc. exp. Biol. 122: 1167 (1966)

12) Cohn, Z. A. and Fedorko, M. E.
Lysosomal form and function
Lysosomes in Biologie and Pathologie, Vol 1, S. 43 (Ed. Dingle, J. T. and Fell, H. B.), North-Holland Publish. Company, Amsterdam, London (1969)

13) Cook, G. M. W., Heard, D. H. and Seaman, G. V.
The electrokinetic characterization of the Ehrlich ascites carcinoma cell
Exp. Cell. Res. 28: 27 (1962)

14) Davie, E. W.
Waterfall sequence for intrinsic blood clotting
Science 145: 1310 (1964)

15) Davies, P., Krakauer, K. and Weissmann, W.
Subcellular distribution of neutral protease and peptidases in rabbit polymorphonuclear leukocytes
Nature228: 761 (1970

16) De Duve, C.
The lysosome in retrospect
Lysosomes in Biologie and Pathologie, Vol 1
S. 3 (Ed. Dingle, J. T. and Fell, H. B.), North-Holland Publish. Company, Amsterdam, London (1969)

17) Folds, J. D., Welsh, I. R. H. and Spitznagel, J. K.
Neutral proteases confined to one class of lysosomes of human polymorphonuclear leukocytes
Proc.Soc. Exp.Biol.Med. 139,2: 461 (1972)

18) Gelfand, E. W., Resch, K. and Prester, M.
Antibody-mediated target cell lysis by non-immune cells, Characterization of the antibody and effector cell populations
Eur. J. Immunol. 2: 419 (1972)

19) Gery, I. Gershon, R. K. and Waksman, B. H.
Potentation of the T-Lymphocyte response to mitogens, I. The responding cell
J. exp. Med. 136: 128 (1972)

20) Gery, I. and Waksman, B. H.
Potentation of the T-Lymphocyte response to mitogens, II. The cellular source of potentiating mediators
J. exp. Med. 136: 143 (1972)

21) Golstein, P., Wigzell, H., Blomgren, H. and Svedmyr, E. A. J.
Cells mediating specific in vitro cytotoxicity II. Probable autonomy of thymuy-processed Lymphocytes (T-cells) for the killing of allogenic target cells
J. exp. Med. 135: 890 (1972)

22) Hakomori, S. and Murakami, W. T.
Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines
Proc.nat.Acad.Sci.,Wash. 59: 254 (1968)

23) Hakomori, S., Teather, C. and Andrews, H.
Organizational difference of cell surface "Hematoside" in normal and virally transformad cells
Biochem.Biophys.Res.Commun. 33: 563 (1968)

24) Havemann, K.
Nucleinsäure und Proteinstoffwechsel in Lymphocytenkulturen von Gesunden und Patienten mit Erkrankungen des Lymphatischen Systems
Z. ges. exp. Med. 151: 138 (1969)

25) Havemann, K., Bürger, S. und Dosch, H. M.
Phythämagglutinin (PHA) und Serumproteine in der Lymphocytenkultur
II. Die Präcipitationen von Serumproteinen durch PHA
Z. ges. exp. Med. 153: 308 (1970)

26) Hozumi, M., Ogawa, M., Sugimura, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H.
Inhibition of tumorigenesis in mouse skin by Leupeptin, a protease inhibitor from Actinomycetes
Cancer Research 32: 1725 (1972)

27) Hynes, R. O.
Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis
Proc.Nat. Acad.Sci. USA 70: No. 11, S. 3170 (1973)

28) Janoff, A. and Zeligs, J. D.
Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leukocytes
Science 161: 702 (1968)

29) Jones, A. L.
The effect of polymophonuclear leukocytes on the blastoid transformation of lymphocytes in mixed leukocyte cultures
Transplantation 4, No.3, S. 337 (1966)

30) Levis, W. H. and Robbins, J. H.
Effect of glass-adherent cells on the blastogenic response of "purified" lymphocytes to phytohemagglutinin
Exp. Cell. Res. 61: 153 (1970)

31) Macfarlane, R. G.
An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier
Nature 202: 498 (1964)

32) Mann, H. B. and Whitney, D. R.
On a test of wether one of two random variables is stochiastically larger than the other
Ann. Math. Statist. 18: 50 (1947)

33) Pike, B. L. and Robinson, W. A.
Human bone marrow colony growth in Agar-gel
J. Cell. Physiol. 76: 77 (1970)

34) Rabinowitz, Y.
Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations
Blood 23: 811 (1964)

35) Resch, K., Ferber, E., Odenthal, J. and Fischer, H.
Early changes in the phospholipid metabolism of lymphocytes following stimulation with phythohemagglutinin and with lysolecithin
Eur. J. Immunol. 1: 162 (1971)

36) Singer, S. J. and Nicolson, G. L.
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes
Science 175: 720 (1972)

37) Thomas, L.
Possible role of leukocyte granules in the Schwartzman and Arthus reactions.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 115: 235 (1964)

38) Uhlenbruck, G. and Gielen, W.
Immunbiologie der Neuraminsäure: ein Beitrag zur Antigenität der Hirntumoren
Fortsch.Ne rol. Psych. 38: 202 (1970)

39) Ward, P. A. and Becker, E. L.
Mechanisms of the inhibition of chemotaxis by phosphonate esters
J. exp. Med. 125: 1001 (1967)

40) Ward, P. A. and Becker, E. L.
The deactivation of rabbit neutrophils by chemotactic factor and the nature of the activatable esterase
J.exp.Med. 127: 693 (1968)

41) Ward, P. A. and Becker, E. L.
beochemical demonstration of the activatable
esterase of the rabbit neutrophil involved
in the chemotactic response
J. Immunol. 105: 1057 (1970)

42) Winkelstein, A.
Augmentation of PHA responsiveness in
mixed thymus-marrow cultures
J. Immunol. 107: 195 (1971)

Tabelle I

Proliferation von Lymphocyten und polymorphkernigen Leukocyten (PKL)

		65 000 PKL	125 000 PKL	250 000 PKL	500 000 PKL
		29 cpm	34 cpm	70 cpm	215 cpm
		31	24	33	66
		27	31	28	94
		25	34	37	51
		23	44	32	55
		25	42	25	
$\bar{x}$		26 cpm	34 cpm	37 cpm	96 cpm
	$1,5 \times 10^6$ Ly	$1,5 \times 10^6$ Ly+ 65 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly + 125 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly+ 250 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly+ 500 000 PKL
	7053 cpm	6115 cpm	8958 cpm	9068 cpm	11011 cpm
	5382	6484	6424	9949	16153
	6243	7080	6947	6297	7625
	5269	5454	7305	8115	4180
	6061	8562	6347	8430	10075
	6508	6367	7465	9575	14538
$\bar{x}$	6086 cpm	6677 cpm	7241 cpm	8572 cpm	10597 cpm
Proliferationssteigerung in %	100 %	109,7 %	119,0 %		
α		./.	0,025	0,01	0,05

Tabelle II

Einfluß von zugesetzten polymorphkernigen Leukocyten im Vergleich zu zugesetzten Lymphocyten

		95000PKL	185000 PKL	375000 PKL	750000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$PKL
			24 cpm	35 cpm	43 cpm	67 cpm
		./.	32	28	36	47
			30	30		98
			47			137
						27
$\bar{x}$			33 cpm	31 cpm	39 cpm	75 cpm
	$1{,}5 \times 10^6$Ly	$1{,}5 \times 10^6$Ly +95000PKL	$1{,}5 \times 10^6$Ly +185000PKL	$1{,}5 \times 10^6$Ly +375000PKL	$1{,}5 \times 10^6$Ly +750000PKL	$1{,}5 \times 10^6$Ly +$1{,}5 \times 10^6$ PKL
708 cpm	489 cpm	1754 cpm	2085 cpm	2548 cpm	2394 cpm	2339 cpm
260	601	1155	1766	3145	2591	4002
524	465	2356	1952	2232	3146	5992
678	795	680	1065	2656	4255	4841
577	1055	1745	2337	3112	2236	4935
		683	2077	2718	3508	6273
$\bar{x}$	615 cpm	1395 cpm	1880 cpm	2735 cpm	3021 cpm	4730 cpm
				$1{,}5 \times 10^6$Ly +375000Ly	$1{,}5 \times 10^6$Ly +750000Ly	
				1206 cpm	1290 cpm	
				1414	1533	
				1828	436	
				927	955	
				764	1117	
$\bar{x}$				1227 cpm	1066 cpm	

Abkürzungen: Ly = Lymphocyten
PKL = polymorphkernige Leukocyten

Tabelle III

Wirkung der Behandlung mit Ammoniumchlorid

a) Wirkung von unbehandelten polymorphkernigen Leukocyten

	$1{,}5 \times 10^6$ Ly	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +185 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +375 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +750 000 PKL
	6815 cpm	25240 cpm	48196 cpm	61083 cpm
	6829	25192	46546	59483
	6336	19379	41792	66564
	9014	23898	31594	59338
$\bar{x}$	7248 cpm	23427 cpm	42032 cpm	61617 cpm
Steigerung der Proliferation in %	100 %	323 %	579 %	850 %
α		0,025	0,025	0,025

b) Wirkung von mit Ammoniumchlorid behandelten polymorphkernigen Leukocyten

	$1{,}5 \times 10^6$ Ly	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +250 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 500 000 PKL
	5467 cpm	10032 cpm	14178 cpm
	5293	12526	16992
	5221	15372	15761
	5544	11815	17975
$\bar{x}$	5381 cpm	12436 cpm	16226 cpm
Proliferationssteigerung in%	100 %	231 %	301 %
α		0,025	0,025

Tabelle IV

Abhängigkeit der Lymphocytenstimulation von der Zelldichte

	185 000 Ly	375 000 Ly	750 000 Ly	$1,5 \times 10^6$ Ly
	31 cpm	66 cpm	718 cpm	3813 cpm
	39	64	430	5037
	35	43	308	3511
	29	143	1094	2785
$\bar{x}$	33 cpm	79 cpm	637 cpm	3786 cpm

	185 000 Ly +300 000 PKL	375 000 Ly +300 000 PKL	750 000 Ly +300 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly + 300 000 PKL
	132 cpm	1170 cpm	5527 cpm	11925 cpm
	185	1561	4674	10962
	126	1105	5997	10572
	321	798	4055	13495
$\bar{x}$	191 cpm	1158 cpm	5063 cpm	11738 cpm

Tabelle V

Vergleich zweier durch polymorphkernige Leukocyten stimulierter Versuche (Stimulation/keine Wirkung)

a) deutliche Stimulation

		75 000 PKL	150 000 PKL	300 000 PKL
		26 cpm	53 cpm	1027 cpm
		36	41	454
		26	60	176
		22	63	932
$\bar{x}$		27 cpm	54 cpm	647 cpm
	$1{,}5 \times 10^6$ Ly	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +75000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +150000PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +300000PKL
	1651 cpm	1746 cpm	4794 cpm	4995 cpm
	1693	3432	4108	5088
	1441	2421	2941	8493
	1888	6501	8310	11253
$\bar{x}$	1668 cpm	3525 cpm	5038 cpm	7457 cpm
Steigerung der Proliferation %	100 %	211 %	302 %	447 %
α		0.025	0.025	0.025

b) keine Stimulation

			250 000 PKL	
			151 cpm	
			114	
			110	
			136	
			112	
$\bar{x}$			124 cpm	
		$1{,}5 \times 10^6$ Ly	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +125 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 250 000 PKL
		7495 cpm	5575 cpm	5841 cpm
		4275	3405	5447
		5872	4191	6180
		3475	4367	6170
		5396	6328	5520
$\bar{x}$		5302 cpm	4773 cpm	5831 cpm
Proliferationssteigerung in %		100 %	90 %	110 %
α			0.10	

Tabelle VI

Zusammenfassende Darstellung aller Versuche, welche die Proliferationsförderung von Lymphocytenkulturen durch polymorphkernige Leukocyten betreffen

$\bar{x}$ = arithmetische Mittelwert der Kulturen eines Versuchs

S = Proliferationssteigerung in Prozent, bezogen auf den Mittelwert der Kulturen des Versuches, die nur Lymphocyten enthielten ($\bar{x}$ nur Lymphocyten = 100 %)

PKL polymorphkernige Leukocyten

$1{,}5 \times 10^6$ Ly.	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 1×10^6 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und $1{,}5 \times 10^6$ PKL
7733cpm										26540cpm		
6170										33206		
11269										30133		
9093										23349		
6205										28157		
7130										29731		
$\bar{x}$ 8023cpm										28519cpm		
S 100 %										355 %		
α										0.01		
27621cpm						34425cpm						
34545						35827						
29019						66599						
38997						41465						
35202						34785						
34771												

	$1,5 \times 10^6$ Ly.	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 25000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 50000–75 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 90000–100 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 125000–150 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 185000–200 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 375000–400 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 500000–600 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 750000–800 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 1×10^6 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und $1,5 \times 10^6$ PKL
$\bar{x}$	33359cpm						42620cpm						
S	100 %						127 %						
α							0.10						
	12080cpm											24494cpm	
	11324											25323	
	10408											23408	
	12947											26173	
	13595											25543	
	13776											18277	
	10394											29476	
	11357												
$\bar{x}$	11985cpm											24670cpm	
S	100%											205 %	
α												0.01	
	6815cpm					25240cpm			48196cpm		61083cpm		
	6829					251921			46546		59483		
	6336					19379			41792		66564		
	9014					23898			31594		59338		
$\bar{x}$	7248cpm					23427cpm			42032cpm		61617cpm		
S	100 %					323 %			579 %		850 %		
α						0.025			0.025		0.025		
	1651cpm		1746cpm		4794cpm			4995cpm					
	1693		3432		4108			5088					
	1441		2421		2941			8493					
	1888		6501		8310			11253					

	$1,5x10^6$ Ly.	$1,5x10^6$ Ly und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50000-75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90000-100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKLQ	$1,5x10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly, und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 1 x 10^6 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1,5x10^6$ PKL
$\bar{x}$	1668cpm		3525cpm		5038cpm			7457cpm					
S	100 %		211 %		302 %			447 %					
α			0.05		0.025			0.025					
	36830cpm		47549cpm		34323cpm			37928cpm		35112cpm			
	31523		60810		27764			42974		26116			
	38323		38474		45405			42073		41183			
	36288		36552		38679			34744		39477			
$\bar{x}$	35741cpm		45846cpm		36542cpm			39429cpm		35472cpm			
S	100 %		128 %		102 %			110 %		99 %			
α			0.10		-			0.10		-			
	6301cpm					10580cpm							
	8861					18599							
	2897					12831							
	13608					13497							
	5820					9603							
$\bar{x}$	7497cpm					13022cpm							
S	100 %					173 %							
α						0.05							
	12311cpm				14806cpm								
	13704				18847								
	16060				18085								
$\bar{x}$	14025cpm				17246cpm								
S	100 %				123 %								
α					0.10								

	$1,5x10^6$ Ly.	$1,5x10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1x10^6$ PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1,5x10^6$ PKL
	18445cpm		26572cpm		44446cpm			27353cpm					
	18452		26467		23256			24366					
	16153		34413		23222			30490					
	13397		30810		28849			29593					
$\bar{x}$	16611cpm		29565cpm		28849cpm			27950cpm					
S	100 %		178 %		173 %			168 %					
α			0.025		0.02			0.025					
	20177cpm		26698cpm		36001cpm			40865cpm					
	19889		29247		31114			27905					
	19487		31274		34228			34048					
	18876		29031		24311			31937					
$\bar{x}$	19607cpm		29062cpm		31413cpm			33688cpm					
S	100 %		148 %		160 %			170 %					
α			0.025		0.025			0.025					
	27834cpm							26303cpm					
	25135							27712					
	23077							29326					
	21941							27199					
	22422							28546					
$\bar{x}$	24081cpm							27817cpm					
S	100 %							115 %					
α								0.05					

	$1,5x10^6$ Ly.	$1,5x10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 1 x 10^6 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1,5x10^6$ PKL
	3521cpm							16974cpm					
	4486							10869					
	674							17084					
	3487							14444					
	1705							12805					
$\bar{x}$	2774cpm							14435cpm					
S	100 %							520 %					
χ^2								0.01					
	31811cpm							17880cpm					
	36285							22996					
	30969							20293					
	35060							29006					
	35323							27738					
	34592							23793					
	24641							19912					
	39782							27779					
	26636							29478					
	19144							20376					
$\bar{x}$	31424cpm							23926cpm					
S	100 %							76 %					
χ^2								0.01					
	5452cpm			4808cpm		6710cpm			7964cpm	20642cpm		3203cpm	
	4363			5866		8170			6872	16425		19719	
	6236			6591		5943			9592	14520		18549	
	6720			7477		4977			11661	11453		19916	
	5806			5981		5575			9879	14297		9667	
	6104			5590		6863			8150	10427		15754	
	5097			6401					8151	12439		20406	

	$1,5x10^6$ Ly.	$1,5x10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 185 000-200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 1×10^6 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und PKL
$\bar{x}$	5682cpm			6102cpm		6373cpm			8895cpm		14314cpm		15316cpm
S	100 %			107 %		112 %			156 %		251 %		269 %
α				-		-			0.01		0.01		0.025
	708cpm			1 754cpm		2085cpm			2548cpm		2394cpm		2339cpm
	260			1155		1766			3145		2591		4002
	524			2356		1952			2232		3146		5992
	678			680		1065			2656		4255		4841
	577			1745		2337			3112		2236		4935
	489			683		2077			2718		3508		6273
	601												
	465												
	795												
	1055												
$\bar{x}$	615cpm			1395cpm		1880cpm			2753cpm		3021cpm		4730cpm
S	100 %			226 %		305 %			444 %		491 %		769 %
α				0.01		0.01			0.01		0.01		0.01
	3813cpm							11925cpm					
	5037							10962					
	3511							10572					
	2785							13495					
$\bar{x}$	3786cpm							11738cpm					
S	100 %							310 %					
α								0.025					

	$1,5 \times 10^6$ Ly.	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 175000-200 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und 1×10^6 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly. und $1,5 \times 10^6$ PKL
	2935cpm									4760cpm			
	3890									6042			
	2022									4323			
	3219									5274			
	1418									3219			
										4765			
$\bar{x}$	2696cpm									4730cpm			
S	100 %									175 %			
α										0.01			
	1340cpm			3885cpm									
	2136			3975									
	1427			3934									
	1698			3075									
	1138			2552									
	1758			3171									
$\bar{x}$	1582cpm			3432cpm									
S	100 %			217 %									
α				0.01									
	4090cpm						8311cpm			7180cpm			
	5906						6142			7409			
	3219						8625			7682			
	4031						6040			8547			
	4733						4502			7049			
$\bar{x}$	4395cpm						6724cpm			7573cpm			
S	100 %						153 %			172 %			
α							0.025			0.01			

	$1{,}5 \times 10^6$ Ly.	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 125 000-150 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 1×10^8 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und $1{,}5 \times 10^8$ PKL
	2234cpm		4426cpm		4538cpm		5021cpm			6135cpm			
	2211		2656		4971		5404			4997			
	3820		4960		4661		4054			5101			
	3522		3963		7053		3948			3988			
	2814		4166		4233		4959			3774			
	3457		4542		2717		3626			4529			
$\bar{x}$	3009cpm		4118cpm		4695cpm		4502cpm			4754cpm			
S	100 %		136 %		156 %		149 %			158 %			
α			0.025		0.025		0.01			0.01			
	7053cpm		6115cpm		8958cpm		9068cpm			11011cpm			
	5382		6484		6424		9949			16153			
	6243		7080		6947		6297			7625			
	5269		5454		7305		8115			4180			
	6061		8562		6347		8430			10075			
	6508		6367		7465		9575			14538			
$\bar{x}$	6086cpm		6677cpm		7241cpm		8572cpm			10597cpm			
S	100 %		109 %		119 %		140 %			174 %			
α			-		0.025		0.01			0.05			
	322cpm									228cpm			
	760									595			
	422									676			
	209									643			
$\bar{x}$	428cpm									535cpm			
S	100 %									125 %			
										-			

	$1,5x10^6$ Ly.	$1,5x10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 750000-850 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 1×10^6 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1,5x10^6$ PKL
	681cpm				961cpm		752cpm			889cpm			
	721				632		1013			839			
	640				705		646			450			
					1032		1244			916			
					744		747			876			
$\bar{x}$	680				814		880			794			
S	100 %				119 %		129 %			116 %			
α					-		0.10			-			
	850cpm				802cpm		228cpm			877cpm			
	614				880		774			776			
					838		932			592			
					1512		900			875			
					841		896			912			
$\bar{x}$	732 cpm				974cpm		746cpm			806cpm			
S	100 %				133 %		101 %			110 %			
α					-		-			-			
	18896cpm									10548cpm		10370cpm	
	8705									15542		10215	
	6710									11131		13884	
	10235									6194		14440	
	9766									10300		12841	
$\bar{x}$	10865cpm									10739cpm		12350cpm	
S	100 %									98 %		113 %	
α										-		-	

	$1{,}5 \times 10^6$ Ly.	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 50 000–75 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 90 000–100 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 125000–150 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 185000–200 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 375000–400 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 500000–600 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 750000–800 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 1×10^6 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und $1{,}5 \times 10^6$ PKL
	7778cpm						11948cpm		14186cpm				
	7061						12545		9160				
	9511						13424		9250				
	10674						15050		10597				
$\bar{x}$	8744 cpm						13241cpm		10798cpm				
S	100 %						151 %		123 %				
α							0.025		–				
	5467cpm						10032cpm			14178cpm			
	5293						12526			16992			
	5221						15372			15761			
	5544						11815			17975			
$\bar{x}$	5281cpm						12436cpm			16226cpm			
S	100 %						231 %			301 %			
α							0.025			0.025			
	7996cpm				4403cpm		5190cpm						
	7102				5872		5964						
	4243				7445		5088						
	7644				8102		6632						
	5180				4782		6506						
$\bar{x}$	6433cpm				6098cpm		5876cpm						
S	100 %				94 %		91 %						
α					–		–						

	$1,5x10^6$ Ly.	$1,5x10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50 000 75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90 000- 100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000- 150 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 185000- 200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000- 400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000- 600 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 750000- 800 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1 x 10^6$ PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1,5x10^6$ PKL
	7495cpm				5575cpm		5841cpm						
	4275				3405		5447						
	5872				4191		6180						
	3475				4367		6170						
	5396				6328		5520						
$\bar{x}$	5302cpm				4773cpm		5831cpm						
S	100 %				90 %		110 %						
α					0.10		-						
	9086cpm							14016cpm					
	9944							14257					
	9457							15113					
	10530							12772					
$\bar{x}$	9754cpm							14039cpm					
S	100 %							143 %					
α								0.025					
	17101cpm					10771cpm							
	12969					12682							
	8723												
$\bar{x}$	12931cpm					11761cpm							
S	100 %					90 %							
α						-							

	$1{,}5 \times 10^6$ Ly.	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 50 000–75 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 90 000–100 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 125000–150 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 185000–200 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 375000–400 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 500000–600 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 750000–800 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und 1×10^6 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly. und $1{,}5 \times 10^6$ PKL
	13252cpm					14690cpm							
	13581					14972							
	12231					17179							
	17281					12341							
$\bar{x}$	14086cpm					14795cpm							
S	100 %					105 %							
α						-							
	3600cpm											8951cpm	
	4318											8586	
	4466											7809	
	2419											6040	
	3790											8844	
$\bar{x}$	3718cpm											8046cpm	
S	100 %											216 %	
α												0.01	
	21090cpm				23139cpm					24327cpm		18394cpm	
	26721				43041					29039		20932	
	34289				46283					24915		22851	
	34650				33968					32289		23406	
$\bar{x}$	29187cpm				36607cpm					27642cpm		21395cpm	
S	100 %				125 %					94 %		73 %	
α					-					-		0.10	

	$1,5x10^6$ Ly.	$1,5x10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 1×10^6 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1,5x10^6$ PKL
	11101cpm												
	12963cpm											17684cpm	
	10777											15012	
	10063												
	9884												
$\bar{x}$	10957cpm												
												16348cpm	
S	100 %												
												149 %	
α													
												0.05	
	29301cpm												
	21681						27048cpm			28275cpm			
	14728						32467			19843			
	20302						30325			19022			
							39395			45191			
$\bar{x}$	21503cpm												
							32308cpm			28082cpm			
S	100 %												
							150 %			130 %			
α													
							0.05			-			
	12270cpm												
	7641											18189cpm	
	7620											21224	
												9470	
$\bar{x}$	9177cpm												
												16294cpm	
S	100 %												
												177 %	
α													
												0.10	

	$1,5x10^6$ LY.	$1,5x10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50 000-75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,6x10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1 x 10^6$ PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1,5x10^6$ PKL
	6767cpm		6510cpm		7293cpm		16108cpm			19032cpm			
	8092		6640		7155		10843			12441			
	5356		7932		7640		10996			13053			
$\bar{x}$	6738cpm		7027cpm		7362cpm		12649cpm			14842cpm			
S	100 %		104 %		109 %		187 %			220 %			
α			-		-		0.05			0.05			
	46257cpm				41493cpm		38084cpm			49420cpm			
	30055				49134		34381			22935			
	39344				40702		47372			42063			
$\bar{x}$	38518cpm				43776cpm		39945cpm			38139cpm			
S	100 %				113 %		103 %			99 %			
α					-		-			-			
	23407cpm		34073cpm		37200cpm		29979cpm			19832cpm			
	22769		37323		26257		25508			21126			
	22394		33484		20317		47808			24674			
$\bar{x}$	22856cpm		34961cpm		27924cpm		34431cpm			21877cpm			
S	100 %		153 %		122 %		150 %			95%			
α			0.05		-		0.05			-			
	6472cpm	11284cpm	9791cpm	11192cpm		8946cpm							
	8149	11998	9018	11465		10843							
	8192	9337	8712	9793		11541							
	6051	8945	9244	12130		7422							

	$1,5x10^6$ Ly.	$1,5x10^6$ Ly. und 25 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 50000-75 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 90 000-100 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 125000-150 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 185000-200 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 250 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 300 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 375000-400 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 500000-600 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und 750000-800 000 PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1 x 10^6$ PKL	$1,5x10^6$ Ly. und $1,5x10^6$ PKL
S	100 %	144 %	127 %	154 %		134 %							
α		0.025	0.025	0.025		0.10							
	10234cpm	8067cpm	11225cpm	10564cpm		11733cpm							
	8456	9335	5997	9986		13700							
	9593	9427	11412	9527		12678							
	10239	12368	10673	10664		13283							
$\bar{x}$	9630cpm	9799cpm	9826cpm	10185cpm		13283cpm							
S	100%	101 %	102 %	105 %		137 %							
α		-	-	-		0.05							
	9559cpm									9443cpm		9086cpm	10657cpm
	7028									13947		17048	18254
	11156									11266		13016	16008
	6645									12483		16359	
$\bar{x}$	8597cpm									11784cpm		13877cpm	14973cpm
S	100 %									137 %		161 %	174 %
α										0.10		0.1.	0.05
	9592cpm									11566cpm		23591cpm	24357cpm
	10994									11715		21197	23859
	6498									9390		12566	22352
	7552									11899			
$\bar{x}$	8659cpm									11142cpm		19118cpm	23522cpm
S	100%									128 %		220 %	271 %
α										0.10		0.05	0.05

Tabelle VII

Abhängigkeit des Wachstums von der Serumkonzentration

	Menge Serum	$1,5 \times 10^6$ Lymphocyten u. Serum
	-	54 cpm
		64
		75
		63
		70
		73
$\bar{x}$		66 cpm
	0,05 ml	123 cpm
		78
		68
		94
		83
		82
$\bar{x}$		88 cpm
	0,2 ml	840 cpm
		564
		616
		600
		447
		586
$\bar{x}$		608 cpm
	0,5 ml	592 cpm
		622
		650
		565
		769
		792
$\bar{x}$		665 cpm

Tabelle VIII

Wirkung von mit polymorphkernigen Leukocyten vorinkubiertem Serum

		300 000 PKL u. Serum vorin. 1 h	300 000 PKL u.Se.vorinkub. 5 h	300 000 PKL u.Se.vorinkub. 21 h	
	$1,5 \times 10^6$ Lymphocyten allein	$1,5 \times 10^6$ Ly Überstand	$1,5 \times 10^6$ Ly + Überstand	$1,5 \times 10^6$ Ly + Überstand	$1,5 \times 10^6$ Ly + 300 000 PKL direkt zugesetzt
	9086 cpm	11937 cpm	10259 cpm	9663 cpm	14016 cpm
	9944	10773	10756	14186	14257
	9457	7079	16392	16672	15113
	10530		12816	13319	12772
$\bar{x}$	9754 cpm	9929 cpm	12555 cpm	13460 cpm	14039 cpm

Tabelle IX

Vergleich: Vorinkubation

polymorphkernige Leukocyten und Serum

polymorphkernige Leukocyten und TC 199

		1×10^6 PKL u.Se.vorin. 1 h	1×10^6 PKL u.Se.vorin. 6 h	1×10^6 PKL u.Se.vorin. 21 h	
	$1{,}5 \times 10^6$ Lymphocyten allein	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + Überstand	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +Überstand	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +Überstand	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 1×10^6 PKL direkt zugesetzt
	12270 cpm	9975 cpm	15866 cpm	10032 cpm	18189 cpm
	7641	13150	18071	15297	21224
	7620	13483	10180	16014	9470
	8153				
	7493				
	14914				
$\bar{x}$	9681 cpm	12202 cpm	14705 cpm	13781 cpm	16294 cpm

	1×10^6 Gran u.TC.vorin. 1 h	1×10^6 Gran u.TC.vorin. 6 h	1×10^6 Gran u.TC.vorin. 21 h
	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +Überstand	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +Überstand	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +Überstand
	8795 cpm	9604 cpm	12161 cpm
	11745	7362	8913
	12290	10656	8013
$\bar{x}$	10943 cpm	9207 cpm	9701 cpm

Tabelle X

Vergleich: Stimulation durch polymorphkernige Leukocyten zerschallt / unzerschallt

	$1{,}5 \times 10^6$ Lymphocyten allein	$1{,}5 \times 10^6$ Lymphocyten +300 000 PKL unzerschallt	$1{,}5 \times 10^6$ Lymphocyten +300 000 PKL zerschallt	allein 300 000 PKL
	3521 cpm	16974 cpm	7923 cpm	96 cpm
	4486	10896	11350	44
	674	17084	13299	43
	3487	14444	11377	31
	1705	12805	8960	27
$\bar{x}$	2774 cpm	14435 cpm	10581 cpm	48 cpm

Tabelle XI

Wirkung von zerschallten polymorphkernigen Leukocyten aktiv/inaktiv (30' bei 56°C)

	$1{,}5 \times 10^6$ Lymphocyten allein	Zahl der PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Lymphocyten u. PKL zerschallt aktiv	$1{,}5 \times 10^6$ Lymphocyten u. PKL zerschallt inaktiv (30' bei 56°C)
	15382 cpm	1×10^6	14876 cpm	10486 cpm
	11661		15193	16040
	13846		14108	12636
$\bar{x}$	13629 cpm		14725 cpm	13054 cpm
		500 000	16894 cpm	14450 cpm
			12890	12172
			11576	12252
$\bar{x}$			13786 cpm	12991 cpm

Tabelle XII

Stimulation durch polymorphkernige Leukocyten-Homogenate
und nach Zentrifugation (1h x 130 000 x g) durch Überstand/Sediment

	$1{,}5 \times 10^6$ Ly allein	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + PKL 500 000 Homogenat	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +500 000 PKL Überstand	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 500 000 PKL Sediment
	84 cpm	48 cpm	101 cpm	97 cpm
	123	93	88	1209
	226	43	74	83
	105	44	85	120
	89	40	119	45
$\bar{x}$	125 cpm	53 cpm	93 cpm	310 cpm

Tabelle XIII

Stimulation durch Neuraminidase

	$1,5 \times 10^6$ Lymphocyten allein	$1,5 \times 10^6$ Ly + 50 IE Neuraminidase + PHA	$1,5 \times 10^6$ Ly + 50 IE Neuraminidase ohne PHA
	7557 cpm	4690 cpm	259 cpm
	3046	10209	186
	8925	22169	168
	11089		149
$\bar{x}$	7654 cpm	12356 cpm	190 cpm

Tabelle XIV

Hemmung der Stimulation durch Proteaseinhibitoren

	$1,5 \times 10^6$ Lymphocyten allein	$1,5 \times 10^6$ Lymphocyten 200 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Lymphocyten 200 000 PKL u. α-1-Antitry.	$1,5 \times 10^6$ Lymphocyten 200 000 PKL u. Aprotinin
	6301 cpm	10580 cpm	11582 cpm	589 cpm
	8861	18599	9375	144
	2897	12831	11579	51
	5820	13497	11237	29
	13608	9603	13503	29
$\bar{x}$	7497 cpm	13022 cpm	11455 cpm	168 cpm

Tabelle XV

Inhibition durch Aprotinin

	$1{,}5 \times 10^6$ Ly	$1{,}5 \times 10^6$ Ly +500 000 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 1×10^6 PKL	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 2×10^6 PKL
	9592 cpm	11566 cpm	23591 cpm	24357 cpm
	10944	11715	21197	23859
	6498	9390	12566	22352
	7552	11899		
$\bar{x}$	8659 cpm	11142 cpm	19118 cpm	23522 cpm

	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + Aprotinin	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 500 000 PKL + Aprotinin	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 1×10^6 PKL + Aprotinin	$1{,}5 \times 10^6$ Ly + 2×10^6 PKL + Aprotinin
	11697 cpm	520 cpm	1268 cpm	1927 cpm
	8265	500	1032	2730
	756	565	1235	2233
	623	513	913	1154
$\bar{x}$	5335 cpm	524 cpm	1112 cpm	2011 cpm

Tabelle XVI

Einfluß der spezifischen Proteaseinhibitors α-1-Antitrypsin und C-1-Esterase-Inhibitor

a) α-1-Antitrypsin

	1,5x10^{6}Ly +200000PKL	1,5 x10^{6}Ly +200000PKL + 375 µg α-1-Antitr. pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL +185 µg α-1-Anti. pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 95 µg α-1-Anti. pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 45 µg α-1-Anti. pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 20 µg α-1-Anti. pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 10 µg α-1-Antitr. pro ml
	10771 cpm	8696 cpm	11013 cpm	9948 cpm	9796 cpm	13418 cpm	8990 cpm
	12682	6507	13756	9632	11212	9778	11964
		8791	9883	8324	11029	11020	9486
$\bar{x}$	11726 cpm	7998 cpm	11550 cpm	9301 cpm	10679 cpm	11405 cpm	10146 cpm

b) C-1-Esteraseinhibitor

	1,5x10^{6}Ly +200000PKL	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 230 µg C-1-Est.in pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 115 µg C-1-Est.in pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 65 µg C-1-Est.in pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 33 µg C-1-Est.in pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 16 µg C-1-Est.in pro ml	1,5x10^{6}Ly +200000PKL + 8 µg C-1-Est.in pro ml
	14690 cpm	8957 cpm	9728 cpm	12039 cpm	10979 cpm	11913 cpm	13390 cpm
	14972	7570	9198	10495	9152	11611	13454
	17179	6280	8074	8139	12400	12833	9263
	12341	9039	10195	8845	13486	9077	14515
$\bar{x}$	14795 cpm	7961 cpm	9298 cpm	9879 cpm	11504 cpm	11358 cpm	12655 cpm

Tabelle XVII

Stimulation durch Tuberkulin (20 µg/Kultur)

	$1,5 \times 10^6$ Ly	$1,5 \times 10^6$ Ly + 250 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly + 500 000 PKL	$1,5 \times 10^6$ Ly + 1×10^6 PKL
	204 cpm	408 cpm	1281 cpm	3868 cpm
	590	201	297	1250
	486	1479	1197	3490
$\bar{x}$	426 cpm	696 cpm	925 cpm	2869 cpm

Lebenslauf

Am 25. 7. 1949 wurde ich, Maria Dorothea Elgeti, geb. Cappeller, als erstes Kind des Physikers Dr. rer. nat. Ulrich Cappeller und seiner Ehefrau Dr. med. Annemarie Cappeller geb. Henseleit in Marburg geboren.

1955 - 59	besuchte ich die Friedrich-Ebert-Schule in Marburg
1959 - 67	Gymnasium Philippinum in Marburg, Abitur
1967 - 70	Studium der Medizin in Marburg, Physikum
1970 SS	Studium an der TU München
1970 - 71	Studium mit einem Auslandsstipendium in Montpellier (faculté de medecine)
1971 - 73	Studium in Marburg, Staatsexamen

Experimentell arbeitete ich an meiner Doktorarbeit ab 1971.

Nach dem Examen im August 1973 begann ich mit dem Schreiben dieser Arbeit.

März 1974 - Juni 1975 Medizinalassistentenzeit an den Universitätskliniken in Marburg und im Zentralkrankenhaus St.-Jürgenstraße in Bremen.

1975 Heirat mit dem Medizinalassistenten Felix Elgeti.

August 1975 Approbation als Arzt.

Seit Oktober 1975 Ass. Ärztin am Path. Institut des Zentralkrankenhauses St. Jürgenstraße in Bremen.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Ammon, Arndt, Astruq, Aurich, Balmes, Baumel, Blömer, Bommer, Braasch, Brachmann, Brück, Caderas de Kerleau, Dimroth, Dittrich, Dölle, Durand, Engelhardt, Exner, Friedrich, Ganz, Gerdes, Golenhofen, Gössner, Graul, Hamelmann, Hardewig, Hensel, Henselmann, Hess, Hohorst, Hort, Jacob, Jakob, Jambon, Jean, Karlson, Koch, Koecke, Kressner, Kühnel, Labauge, Ley, Linneweh, Loubatière, Marh, Mann, Martini, Nesswetha, Nöth, Pabst, Pagès, Petry, Portig, Prioton, Reim, Reiter, Rohen, Schäfer, Schleyer, Schmidt, Schmitz-Mormann, Serre, Siegert, Spiegelberg, Stickl, Straub, Stuke, Thieme, Toppel, Uhlarik, Vogt, Walcher, Wehrmeyer, Zilliken.